

51457-2000300-10361



# DELPHION

[Log Out](#) [Work Files](#) [Saved Searches](#)**RESEARCH****PRODUCTS****INSIDE DELPHION**[My Account](#)[Search: Quick/Number](#) [Boolean](#) [Advanced](#) [Derwent](#)[Help](#)

## The Delphion Integrated View: INPADOC Record

Get Now: ☒ PDF | [More choices...](#)Tools: [Add to Work File](#): [Create new Work File](#) ☒ [Add](#)View: Jump to: [Top](#) ☒ Go to: [Derwent](#)☒ [Email this to a friend](#)

**Title:** **CN1249815A: Electrochemical detector for detecting intermolecular interaction and for use in drug development**

**Derwent Title:** Apparatus for electrochemically detecting binding - for use in biochemical analyses, drug development and protein purification assays [Derwent Record]

**Country:** CN China**Kind:** A Unexamined APPLIC. open to Public inspection I (See also: [CN1249815T](#))**Inventor:** D. M. FOWLKES; United States of America

H. H. THORP; United States of America

**Assignee:** THE UNIV. OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL United States of America[News](#), [Profiles](#), [Stocks](#) and [More about this company](#)High  
Resolution**Published / Filed:** **2000-04-05** / 1998-02-06**Application** **CN1998000802990****Number:****IPC Code:** [G01N 33/543](#); [G01N 33/532](#); [G01N 33/58](#);**ECLA Code:** None**Priority Number:** 1997-02-06 **US1997000036919P**  
1997-09-16 **US1997000059049P****INPADOC**  
**Legal Status:** None [Get Now: Family Legal Status Report](#)**Family:**

PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title
<input checked="" type="checkbox"/>	WO9835232A3	1999-03-04	1998-02-06	ELECTROCHEMICAL PROBES FOR DETECTION OF MOLECULAR INTERACTIONS AND DRUG DISCOVERY

<input checked="" type="checkbox"/>	WO9835232A2	1998-08-13	1998-02-06	ELECTROCHEMICAL PROBES FOR DETECTION OF MOLECULAR INTERACTIONS AND DRUG DISCOVERY
<input checked="" type="checkbox"/>	US20020012943A1	2002-01-31	1998-02-06	ELECTROCHEMICAL PROBES FOR DETECTION OF MOLECULAR INTERACTIONS AND DRUG DISCOVERY
<input checked="" type="checkbox"/>	NZ0336910A	2001-09-28	1998-02-06	ELECTROCHEMICAL PROBES FOR DETECTION OF MOLECULAR INTERACTIONS AND DRUG DISCOVERY
<input checked="" type="checkbox"/>	NO0993764A0	1999-08-03	1999-08-03	ELEKTROKJEMISKE PROBER FOR DETEKSJON AV MOLEKYLAERE INTERAKSJONER OG LEGEMIDDELOPPDAGELSE
<input checked="" type="checkbox"/>	NO0993764A	1999-09-28	1999-08-03	ELEKTROKJEMISKE PROBER FOR DETEKSJON AV MOLEKYLAERE INTERAKSJONER OG LEGEMIDDELOPPDAGELSE
<input checked="" type="checkbox"/>	JP2002524021T2	2002-07-30	1998-02-06	
<input checked="" type="checkbox"/>	EP0970375A2	2000-01-12	1998-02-06	ELECTROCHEMICAL PROBES FOR DETECTION OF MOLECULAR INTERACTIONS AND DRUG DISCOVERY
<input checked="" type="checkbox"/>	CN1249815T	2000-04-05	1998-02-06	Electrochemical detector for detecting intermolecular interaction and for use in drug development
<input checked="" type="checkbox"/>	CN1249815A	2000-04-05	1998-02-06	Electrochemical detector for detecting intermolecular interaction and for use in drug development
<input checked="" type="checkbox"/>	CA2279571AA	1998-08-13	1998-02-06	ELECTROCHEMICAL PROBES FOR DETECTION OF MOLECULAR INTERACTIONS AND DRUG DISCOVERY
<input checked="" type="checkbox"/>	AU6651798A1	1998-08-26	1998-02-06	ELECTROCHEMICAL PROBES FOR DETECTION OF MOLECULAR INTERACTIONS AND DRUG DISCOVERY
<input checked="" type="checkbox"/>	AU0729118B2	2001-01-25	1998-02-06	ELECTROCHEMICAL PROBES FOR DETECTION OF MOLECULAR INTERACTIONS AND DRUG DISCOVERY
13 family members shown above				

Other Abstract Info: None



Nominate this for the Gallery...

THOMSON

Subscriptions | Web Seminars | Privacy | Terms & Conditions | Site Map | Contact Us | Help

Copyright © 1997-2005 The Thomson Corporation

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/543

G01N 33/532 G01N 33/58

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98802990.1

[43]公开日 2000年4月5日

[11]公开号 CN 1249815A

[22]申请日 1998.2.6 [21]申请号 98802990.1

[30]优先权

[32]1997.2.6 [33]US [31]60/036,919

[32]1997.9.16 [33]US [31]60/059,049

[86]国际申请 PCT/US98/02440 1998.2.6

[87]国际公布 WO98/35232 英 1998.8.13

[85]进入国家阶段日期 1999.8.31

[71]申请人 查珀尔希尔北卡罗来纳大学

地址 美国北卡罗来纳州

共同申请人 萨森公司

[72]发明人 D·M·福奇斯 H·H·索尔普

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事  
务所

代理人 樊卫民

权利要求书 13 页 说明书 51 页 附图页数 16 页

[54]发明名称 用于分子相互作用的检测和药物发现的电  
化学探针

[57]摘要

本发明涉及进行电化学分析的方法和装置。本发明提供一种在电化学介质的存在下进行电势分析的电化学装置,用于检测固定于电极上的生物结合对的第一种成分与电化学标记的生物结合对的第二种成分之间的特异性结合。提供了使用本发明的装置进行结合和竞争性结合测定的方法。本发明也提供了进行高通量筛选测定的方法,用于检测生物结合对成分之间的特异性结合的抑制,以用于药物开发、生物化学分析和蛋白质纯化测定。

ISSN 1008-4274

## 权利要求书

1. 一种进行电化学测定的装置，用于检测生物结合对的成分之间的结合，该装置包括：

第一种电极，其中该电极包含一种导电的或半导电的材料，并且该电极具有用多孔的、亲水的、聚合层包被的表面，生物结合对的第一种成分固定于该层上，

第二种参比电极，其包含一种与电解质水溶液接触的导电金属，

第三种辅助电极，其包含一种导电金属

其中，每种电极与稳压器电连接，该装置进一步包括

一种包含电解质溶液的反应室，其中每种电极与其电化学接触，该溶液进一步包含

一种电化学介质，其包含在对电极施加电势的条件下能参与与该电极的还原/氧化反应的化学物种，其中该溶液进一步包含

生物结合对的第二种成分，其中此第二种成分用一种化学物种电化学标记，该化学物种在对电极施加电势的条件下能参与与电化学介质的还原/氧化反应，

在生物结合对的第二种成分与生物结合对的第一种成分结合的条件下，当对电极施加电势时，产生电流。

2. 根据权利要求 1 的装置，其中电化学测定是循环伏安法。

3. 根据权利要求 1 的装置，其中该装置进一步包括多重每种电极和多种反应室，其中每一反应室包含一种电解质，并与该装置中多重电极中三种电极的每一种电化学接触。

4. 根据权利要求 1 的装置，其中生物结合对的第二种成分用钌电化学标记。

5. 根据权利要求 1 的装置，其中电化学介质是钌化合物。

6. 根据权利要求 1 的装置，其中生物结合对的第一种成分是受体蛋白质或其配体结合片段，而生物结合对的第二种成分是可与该受体蛋白质特异性结合的配体。

7. 根据权利要求 1 的装置, 其中生物结合对的第一种成分是抗体蛋白质或其抗原结合片段, 而生物结合对的第二种成分是可与该抗体特异性结合的抗原。

8. 根据权利要求 1 的装置, 其中生物结合对的第一种成分是第一种蛋白质或其片段, 而生物结合对的第二种成分是可与第一种蛋白质特异性结合的第二种蛋白质或其片段。

9. 一种包含导电或半导体材料的电极, 其中该电极具有用多孔的、亲水的、聚合层包被的表面, 生物结合对的第一种成分固定于该层上。

10. 一种试剂盒, 用于制备根据权利要求 9 的电极, 其中该试剂盒包括含导电或半导体材料的电极、生物结合对的第一种成分、在电极表面上制备多孔的亲水的聚合层的试剂、以及将生物结合对的第一种成分固定于电极表面上多孔的亲水的聚合层内的试剂。

11. 一种方法, 用于制备根据权利要求 9 的电极, 包括下列步骤:

- a) 提供一种包含导电或半导体材料的电极;
- b) 在电极表面上制备多孔的、亲水的、聚合层; 以及
- c) 将生物结合对的第一种成分固定于电极表面上多孔的、亲水的、聚合层内。

12. 一种电化学标记的替代配体, 它包含生物结合对的第二种成分, 该成分具有对生物结合对第一种成分的约 1 纳摩尔 (nM) 到约 100 微摩尔 ( $\mu$ M) 的结合亲和力。

13. 根据权利要求 12 的电化学标记的替代配体, 它用钌化合物标记。

14. 根据权利要求 12 的电化学标记的替代配体, 它包含下列通式的肽:

Gly-His-Gly-Ser-Gly-Arg-Ala-Leu-Pro-Pro-Leu-Pro-Arg-Tyr-<sub>NEZ</sub>(SEQ ID No.: 1);

His-Gly-Ser-Gly-Ser-Phe-Ser-His-Pro-Gln-Asn-Thr (SEQ ID No.: 2);

生物素-His-His-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gln-Thr-Phe-Ser-Asp-Leu-Trp-Lys-Leu (SEQ ID No.: 3),

Arg-Pro-Leu-Pro-Pro-Leu-Pro (SEQ ID NO.: 4),

**Ala-Pro-Pro-Val-Pro-Pro-Arg**

**( SEQ ID NO.: 5),**

**或**

**Leu-Tyr-Ser-Trp-Pro-Asp-Glu-Gln-Tyr-Glu-Arg-Pro-Ser-Gly-Ser-Gly-Lys ( SEQ ID No.: 6).**

**15. 根据权利要求 1 的电化学介质, 其包含钌化合物。**

**16. 一种方法, 它使用根据权利要求 1 的装置检测电化学标记的生物结合对第二种成分与固定于电极上的生物结合对第一种成分的结合, 该方法包括步骤:**

**a) 提供第一种反应室, 它与本发明的装置的每种电极电化学接触, 其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分, 并提供第二种反应室, 它与根据权利要求 1 的每种电极电化学接触, 其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分, 每种电极与稳压器电连接;**

**其中, 第一种反应室包含根据权利要求 1 的电化学介质和电化学标记的生物结合对的第二种成分, 该成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合, 其中, 第二种反应室包含根据权利要求 1 的电化学介质和电化学标记的物种, 该物种不与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合; 该方法进一步包括下列步骤:**

**b) 在权利要求 1 的装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电化学测定, 以使该装置的电极中产生电流; 和**

**c) 将第一种反应室中电化学测定所产生的电流与第二种反应室中电化学测定所产生的电流相比较**

**其中, 根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流, 检测电化学标记的生物结合对第二种成分与固定的生物结合对第一种成分的结合。**

**17. 一种方法, 它使用根据权利要求 1 的装置, 鉴定电化学标记的生物结合对第二种成分与固定于电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂, 该方法包括步骤:**

**a) 提供第一种反应室, 它与根据权利要求 1 的每种电极电化学接触, 其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分, 并提供第二**

种反应室，它与根据权利要求1的每种电极电学接触，其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分，每种电极与稳压器电连接；

其中，每种反应室包含根据权利要求1的电化学介质和电化学标记的生物结合对的第二种成分，该成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，其中第二种反应室进一步包含生物结合对第二种成分的结合的抑制剂，该第二种成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合；该方法进一步包括下列步骤：

b) 在权利要求1的装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电学测定，以使该装置的电极中产生电流；和

c) 将第一种反应室中电学测定所产生的电流与第二种反应室中电学测定所产生的电流相比较

其中，根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流，鉴定电化学标记的生物结合对第二种成分与固定的生物结合对第一种成分结合的抑制剂。

18. 一种方法，它使用根据权利要求1的装置，为了得到电化学标记的生物结合对第二种成分与固定于电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂而筛选复杂化学混合物，该方法包括步骤：

a) 提供第一种反应室，它与根据权利要求1的每种电极电学接触，其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分，并提供第二种反应室，它与根据权利要求1的每种电极电学接触，其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分，每种电极与稳压器电连接；

其中，每种反应室包含根据权利要求1的电化学介质和电化学标记的生物结合对的第二种成分，该成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，其中，第二种反应室进一步包含一部分复杂混合物，该混合物包含生物结合对第二种成分的结合的抑制剂，该第二种成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合；该方法进一步包括下列步骤：

b) 在权利要求1的装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电学测定，以使该装置的电极中产生电流；和

c) 将第一种反应室中电学测定所产生的电流与第二种反应室中电

化学测定所产生的电流相比较

其中，根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流鉴定复杂混合物，该混合物含有电化学标记的生物结合对第二种成分与固定的生物结合对第一种成分结合的抑制剂。

19. 根据权利要求 16 的方法，其中生物结合对的第二种成分是电化学标记的替代配体。

20. 根据权利要求 17 的方法，其中生物结合对的第二种成分是电化学标记的替代配体。

21. 根据权利要求 18 的方法，其中生物结合对的第二种成分是电化学标记的替代配体。

22. 根据权利要求 18 的方法，其包括下列附加步骤：

d) 化学分级分离复杂混合物，该混合物含有生物结合对第二种成分与固定于第一种电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂，以产生分级分离的亚混合物；和

e) 对每种分级分离的亚混合物进行权利要求 18 的方法的步骤 (a) 到 (c)，以鉴定含有生物结合对结合的抑制剂的亚混合物。

23. 一种进行电化学测定的装置，用于检测生物结合对的成分之间的结合，该装置包括

第一种电极，其中该电极包含导电的或半导电的材料，并且该电极具有用多孔的、亲水的、聚合层包被的表面，其中生物结合对的第一种成分和一种电化学介质固定于该层上，该电化学介质包含在对电极施加电势的条件下能参与与该电极的还原/氧化反应的化学物种，

第二种参比电极，其包含一种与电解质水溶液接触的导电金属。

第三种辅助电极，其包含一种导电金属

其中每种电极与稳压器电连接，该装置进一步包括

一种包含电解质溶液的反应室，其中每种电极与其电化学接触，该溶液进一步包含

生物结合对的第二种成分，其中此第二种成分用一种化学物种电化学标记，在对电极施加电势的条件下，该化学物种能参与与电化学介质的还



## 原/氧化反应

在生物结合对的第二种成分与生物结合对的第一种成分结合的条件下，当对电极施加电势时，在该装置中产生电流。

24. 根据权利要求 23 的装置，其中电化学测定是循环伏安法。

25. 根据权利要求 23 的装置，其中该装置进一步包括多重每种电极和多种反应室，每一反应室包含一种电解质，并与该装置中多重电极中三种电极的每一种电化学接触，

26. 根据权利要求 23 的装置，其中生物结合对的第二种成分用钉电化学标记。

27. 根据权利要求 23 的装置，其中电化学介质是钽化合物。

28. 根据权利要求 23 的装置，其中电化学介质是钉化合物。

29. 根据权利要求 23 的装置，其中生物结合对的第一种成分是受体蛋白质或其配体结合片段，而生物结合对的第二种成分是与该受体蛋白质特异性结合的配体。

30. 根据权利要求 23 的装置，其中生物结合对的第一种成分是抗体蛋白质或其抗原结合片段，而生物结合对的第二种成分是与该抗体特异性结合的抗原。

31. 根据权利要求 23 的装置，其中生物结合对的第一种成分是第一种蛋白质或其片段，而生物结合对的第二种成分是与第一种蛋白质特异性结合的第二种蛋白质或其片段。

32. 一种包含导电或半导体材料的电极，其中该电极具有用多孔的、亲水的、聚合层包被的表面，生物结合对的第一种成分和一种电化学介质固定于该层上，该电化学介质包含在对电极施加电势的条件下能参与与该电极的还原/氧化反应的化学物种。

33. 一种制备根据权利要求 32 的电极的试剂盒，其中该试剂盒包括含导电或半导体材料的电极、电化学介质、生物结合对的第一种成分、在电极表面上制备多孔的亲水的聚合层的试剂、以及将生物结合对的第一种成分和电化学介质固定于电极表面上多孔的亲水的聚合层内的试剂。

34. 一种制备根据权利要求 32 的电极的方法，其包括下列步骤：

- a) 提供一种包含导电或半导体材料的电极;
- b) 在电极表面上制备多孔的、亲水的、聚合层; 以及
- c) 将生物结合对的第一种成分和电化学介质固定于电极表面上多孔的、亲水的、聚合层内。

35. 一种方法, 它使用根据权利要求23的装置, 检测电化学标记的生物结合对第二种成分与固定于电极上的生物结合对第一种成分的结合, 该方法包括步骤:

- a) 提供第一种反应室, 它与根据权利要求23的每种电极电化学接触, 其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分, 并提供第二种反应室, 它与根据权利要求23的每种电极电化学接触, 其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分, 每种电极与稳压器电连接;

其中第一种反应室包含电化学标记的生物结合对的第二种成分, 该成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合, 其中第二种反应室包含电化学标记的物种, 该物种不与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合; 该方法进一步包括下列步骤:

- b) 在权利要求23的装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电化学测定, 以使该装置的电极中产生电流; 和

- c) 将第一种反应室中电化学测定所产生的电流与第二种反应室中电化学测定所产生的电流相比较

其中根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流, 检测电化学标记的生物结合对第二种成分与固定的生物结合对第一种成分的结合。

36. 一种方法, 它使用根据权利要求23的装置, 鉴定电化学标记的生物结合对第二种成分与固定于电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂, 该方法包括步骤:

- a) 提供第一种反应室, 它与根据权利要求23的每种电极电化学接触, 其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分, 并提供第二种反应室, 它与根据权利要求23的每种电极电化学接触, 其中第一种

电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分，每种电极与稳压器电连接；

其中每种反应室包含电化学标记的生物结合对的第二种成分，该成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，其中第二种反应室进一步包含生物结合对第二种成分的结合的抑制剂，该第二种成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合；该方法进一步包括下列步骤：

b) 在权利要求23的装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电化学测定，以使该装置的电极中产生电流；和

c) 将第一种反应室中电化学测定所产生的电流与第二种反应室中电化学测定所产生的电流相比较

其中根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流，鉴定电化学标记的生物结合对第二种成分与固定的生物结合对第一种成分结合的抑制剂。

37. 一种方法，它使用根据权利要求23的装置，为了得到电化学标记的生物结合对第二种成分与固定于电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂而筛选复杂化学混合物，该方法包括步骤：

a) 提供第一种反应室，它与根据权利要求23的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分，并提供第二种反应室，它与根据权利要求23的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分，每种电极与稳压器电连接；

其中每种反应室包含电化学标记的生物结合对的第二种成分，该成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，其中第二种反应室进一步包含一部分复杂混合物，该混合物包含生物结合对第二种成分的结合的抑制剂，该第二种成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合；该方法进一步包括下列步骤：

b) 在权利要求23的装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电化学测定，以使该装置的电极中产生电流；和

c) 将第一种反应室中电化学测定所产生的电流与第二种反应室中电

化学测定所产生的电流相比较

其中根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流鉴定复杂混合物，该混合物含有电化学标记的生物结合对第二种成分与固定的生物结合对第一种成分结合的抑制剂。

38. 根据权利要求 35 的方法，其中生物结合对的第二种成分是电化学标记的替代配体。

39. 根据权利要求 36 的方法，其中生物结合对的第二种成分是电化学标记的替代配体。

40. 根据权利要求 37 的方法，其中生物结合对的第二种成分是电化学标记的替代配体。

41. 根据权利要求 37 的方法，其进一步包括下列附加步骤：

d) 化学分级分离复杂混合物，该混合物含有生物结合对第二种成分与固定于第一种电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂，以产生分级分离的亚混合物；和

e) 对每种分级分离的亚混合物进行权利要求 37 的方法的步骤 (a) 到 (c)，以鉴定含有生物结合对结合的抑制剂的亚混合物。

42. 一种进行电化学测定的方法，用于检测生物结合对的成分之间的结合，该装置包括：

第一种电极，其中该电极包含导电的或半导电的材料，并且该电极具有用多孔的、亲水的、聚合层包被的表面，其中生物结合对的第一种成分和一种电化学介质固定于该层上，该电化学介质包含在对电极施加电势的条件下能参与与该电极的还原/氧化反应的化学物种，

第二种参比电极，其包含一种与电解质水溶液接触的导电金属，

第三种辅助电极，其包含一种导电金属

其中每种电极与稳压器电连接，该装置进一步包括

一种包含电解质溶液的反应室，其中每种电极与其电化学接触，该溶液进一步包含

生物结合对的第二种成分，其中此第二种成分与电化学催化剂相结合，在对电极施加电势的条件下该催化剂能参与与电化学介质的还原/氧

化反应，其中反应室中的电解质溶液进一步包含该电化学催化剂的底物

在与生物结合对第二种成分结合的电化学催化剂的底物存在下，在生物结合对的第二种成分与生物结合对的第一种成分结合的条件下，当对电极施加电势时，在该装置中产生电流。

43. 根据权利要求 42 的装置，其中电化学测定是计时安培分析法。

44. 根据权利要求 42 的装置，其中该装置进一步包括多重每种电极和多种反应室，每一反应室包含一种电解质，并与装置中多重电极中三种电极的每一种电化学接触。

45. 根据权利要求 42 的装置，其中与生物结合对第二种成分结合的电化学催化剂是酶。

46. 根据权利要求 45 的装置，其中该酶是辣根过氧化物酶。

47. 根据权利要求 42 的装置，其中电化学介质是钯化合物。

48. 根据权利要求 42 的装置，其中生物结合对的第一种成分是受体蛋白质或其配体结合片段，而生物结合对的第二种成分是与该受体蛋白质特异性结合的配体。

49. 根据权利要求 42 的装置，其中生物结合对的第一种成分是抗体蛋白质或其抗原结合片段，而生物结合对的第二种成分是与该抗体特异性结合的抗原。

50. 根据权利要求 42 的装置，其中生物结合对的第一种成分是第一蛋白质或其片段，而生物结合对的第二种成分是与第一种蛋白质特异性结合的第二种蛋白质或其片段。

51. 一种方法，它使用根据权利要求 42 的装置检测电化学标记的生物结合对第二种成分与固定于电极上的生物结合对第一种成分的结合，该方法包括步骤：

a) 提供第一种反应室，它与根据权利要求 42 的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分，并提供第二种反应室，它与根据权利要求 42 的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分，每种电极与稳压器电连接；

其中第一种反应室包含电化学催化剂的底物和与电化学催化剂结合的生物结合对的第二种成分，该成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，其中第二种反应室包含该电化学催化剂的底物和与电化学催化剂结合的化学物种，该物种不与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合；该方法进一步包括下列步骤：

b) 在权利要求42的装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电化学测定，以使该装置的电极中产生电流；和

c) 将第一种反应室中电化学测定所产生的电流与第二种反应室中电化学测定所产生的电流相比较

其中根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流，检测生物结合对的第二种成分与固定的生物结合对第一种成分的结合。

52. 一种方法，它使用根据权利要求 42 的装置，鉴定电化学标记的生物结合对第二种成分与固定于电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂，该方法包括步骤：

a) 提供第一种反应室，它与根据权利要求42的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分，并提供第二种反应室，它与根据权利要求42的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分，每种电极与稳压器电连接；

其中每种反应室包含电化学催化剂的底物和与电化学催化剂结合的生物结合对的第二种成分，该成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，其中第二种反应室进一步包含生物结合对第二种成分的结合的抑制剂，并进一步包含电化学催化剂的底物，该第二种成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合；该方法进一步包括下列步骤：

b) 在权利要求42的装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电化学测定，以使该装置的电极中产生电流；和

c) 将第一种反应室中电化学测定所产生的电流与第二种反应室中电化学测定所产生的电流相比较

其中根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流，鉴定

生物结合对的第二种成分与固定的生物结合对第一种成分结合的抑制剂。

53. 一种方法，它使用根据权利要求42的装置，为了得到电化学标记的生物结合对第二种成分与固定于电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂而筛选复杂化学混合物，该方法包括步骤：

a) 提供第一种反应室，它与根据权利要求42的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分，并提供第二种反应室，它与根据权利要求42的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分，每种电极与稳压器电连接；

其中每种反应室包含电化学催化剂的底物和与电化学催化剂结合的生物结合对的第二种成分，该成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，其中第二种反应室进一步包含一部分复杂混合物，该混合物包含生物结合对第二种成分的结合的抑制剂并进一步包含电化学催化剂的底物，该第二种成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合；该方法进一步包括下列步骤：

b) 在根据权利要求42的装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电化学测定，以使该装置的电极中产生电流；和

c) 将第一种反应室中电化学测定所产生的电流与第二种反应室中电化学测定所产生的电流相比较

其中根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流鉴定复杂混合物，该混合物含有生物结合对的第二种成分与固定的生物结合对第一种成分的结合的抑制剂。

54. 根据权利要求 51 的方法，其中生物结合对的第二种成分是替代配体。

55. 根据权利要求 52 的方法，其中生物结合对的第二种成分是替代配体。

56. 根据权利要求 53 的方法，其中生物结合对的第二种成分是替代配体。

57. 根据权利要求 53 的方法，其包括下列附加步骤：

d) 化学分级分离复杂混合物, 该混合物含有生物结合对第二种成分与固定于第一种电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂, 以产生分级分离的亚混合物; 和

e) 对每种分级分离的亚混合物进行权利要求53的方法的步骤(a)到(c), 以鉴定含有生物结合对结合的抑制剂的亚混合物。

58. 根据权利要求 55 的方法, 其中在向第二种反应室中加入替代配体之后将抑制剂加入第二种反应室中。

59. 根据权利要求 55 的方法, 其中在向第二种反应室中加入替代配体之前将抑制剂加入第二种反应室中。

60. 根据权利要求 55 的方法, 其中在向第二种反应室中加入替代配体的同时将抑制剂加入第二种反应室中。



# 说明书

## 用于分子相互作用的检测和药物发现的电化学探针

### 发明背景

#### 发明领域

本发明涉及进行电化学分析的方法和装置，该电化学分析依赖于生物结合对的成分之间的特异性结合。特别地，本发明提供一种在电化学介质的存在下进行电势分析的电化学分析装置，用于检测固定于电极上的生物结合对的第一种成分与电化学标记的生物结合对的第二种成分之间的特异性结合。另外，在电化学介质和电化学催化剂的底物的存在下，生物结合对的第二种成分与一种电化学催化剂，优选地酶，最优选地氧化还原酶相连接。特别是，本发明提供了一种装置，用于在电化学标记的生物学活性结合物种的存在下，对外加电压范围外产生的电流进行循环伏安分析。也提供了使用本发明的装置进行结合和竞争性结合测定的方法，特别是使用生物学活性化学物种的复杂混合物进行竞争性结合测定。本发明也提供进行高通量筛选测定的方法，用于检测生物结合对成分之间的特异性结合的抑制，以用于药物开发、生物化学分析和蛋白质纯化测定。

#### 现有技术背景

1996年7月9日授权于Vreeke等人的美国专利5,534,132公开了一种用于检测亲和反应的电极。

1993年11月16日授权于Gregg等人的美国专利5,262,035公开了一种使用氧化还原酶的生物传感器电极。

Vogt等人，1965，无机化学（*Inorg. Chem.*）4:1157-1163描述了钌-二氧化硫配位化合物。

Ford等人，1968，美国化学学会杂志（*J Amer. Chem. Soc.*）90:1187-1194 描述了芳族氮杂环的五胺钌复合物的合成。

Yocum等人，1982，美国国家科学院学报（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*）

79: 7052-7055 描述了马心高铁细胞色素c的五胺衍生物的制备。

Nocera等人, 1984, 美国化学学会杂志 106: 5145-5150描述了钉修饰的细胞色素c中从 $\text{Ru}^{\text{II}}$ 到 $\text{Fe}^{\text{III}}$ 的分子内电子转移的动力学。

Devlin等人, 1990, 科学 (*Science*) 249: 404-406描述了随机肽库。

Hirai和Varmus, 1990, 分子细胞生物学 (*Molec. Cell. Biol.*) 10:1307-1318 描述了src同源结构域3的定点突变。

Lam等人, 1991, 自然 (伦敦) (*Nature (London)*) 354: 82-84描述了随机肽库。

Burrows等人, 1991, 欧洲生物化学杂志 (*Eur. J. Biochem.*) 202: 543-549 描述了蛋白质的直接电化学。

Wanatabe-Fukunaga等人, 1992, 自然(伦敦) 356: 314-317描述了作为编程性细胞死亡因子的fas。

Salamon等人, 1992, 生物化学与生物物理学档案 (*Arch. Biochem. Biophys.*) 299:193-198描述了硫氧还蛋白和谷胱甘肽的直接电化学。

Oldenburg等人, 1992, 美国国家科学院学报 89: 5393-5397描述了随机肽库。

Scott等人, 1992, 美国国家科学院学报 89: 5398-5402描述了随机肽库。

Hammer等人, 1992, 实验医学杂志 (*J. Exp. Med.*) 176:1007-1013 描述了随机肽库。

Tsai和Weber, 1992, 分析化学 (*Anal. Chem.*) 64: 2897-2903描述了酪氨酸对铜蛋白复合物检测的影响。

O'Neil等人, 1992, 蛋白质: 结构与遗传学 (*Proteins: Structure, Function & Genetics*) 14: 509-515描述了使用噬菌体显示文库获得的GPIIb/IIIa拮抗物。

Yu等人, 1992, 科学 258:1665-1668描述了src同源结构域3。

Dedman等人, 1993, 生物化学杂志 (*J. Biol. Chem.*) 268: 23025-23030 描述了随机肽库。

Chen等人, 1993, 美国化学学会杂志 115:12591-12592使用噬菌体显

示文库描述了src同源结构域3结合的配体。

Kay等人, 1993, 基因 (*Gene*) 128: 59-65描述了随机肽库。

Hammer等人, 1993, 细胞 (*Cell*) 74:197-203描述了MHC-结合肽。

Rozakis-Adcock等人, 1993, 自然(伦敦) 363: 83-85描述了src SH3结构域。

Salamon等人, 1993, 美国国家科学院学报 90:6420-6423描述了使用含人造脂双层和膜内在蛋白质的电极对循环电流电压反应的直接测定。

Qureshi等人, 1993, 生物医学层析 (*Biomed. Chromatog.*) 7: 251-255描述了检测含生物活性肽的HPLC级分的方法。

Okada等人, 1993, 生物化学杂志 268:18070-18075描述了SH3-缺失的src突变体。

Koivunen等人, 1993, 生物化学杂志 268:20205-20210描述了噬菌体显示文库。

Koivunen等人, 1993, 细胞生物学杂志 (*J Cell Biol.*) 124: 373-380描述了噬菌体显示文库。

Hiramatsu等人, 1994, 生物化学杂志 (*J. Biochem.*) 115: 584-589描述了多胺的电化学检测。

Johnston等人, 1994, 无机化学 33: 6388-6390描述了在锡氧化锡电极处DNA的铼介导的电催化氧化, 其作为在溶液中对DNA裂解进行伏安法检测的一种方法。

Picksley等人, 1994, 癌基因 (*Oncogene*) 9: 2523-2529描述了p53和MDM 2之间的结合。

Fong等人, 1994, 药物发展研究 (*Drug. Develop. Res.*) 33:64-70描述了用噬菌体显示文库扫描全细胞。

Yu等人, 1994, 细胞 76: 933-945描述了src同源结构域3片段。

Uchida和Kawakishi, 1994, 生物化学杂志 269: 2405-2410描述了在Cu、Zn超氧化物歧化酶活性位点的氧化组氨酸的鉴定。

Biachini和Wild, 1994, 毒理学通讯 (*Toxicol. Lett.*) 72:175-184描述了7-甲基脱氧鸟苷的电化学检测。

Cummings等人, 1994, 层析杂志 (J.Chromatog.) B 653:192-203 描述了神经肽生长因子拮抗物的电化学检测。

Mitton和Trevithick, 1994, 酶学方法 (Methods Enzymol.) 233: 523-539 描述了用于检测脊椎动物晶状体中抗氧化剂化合物的HPLC级分的电化学检测。

Daniels和Lane, 1994, 分子生物学杂志 243: 639-652描述了随机肽库。

Sparks等人, 1994, 生物化学杂志 269: 23853-23856描述了src同源结构域3片段。

Cheadle等人, 1994, 生物化学杂志 269: 24034-24039描述了src同源结构域3片段。

Rickles等人, 1994, EMBO J. 13: 5598-5604使用噬菌体显示文库描述了src同源结构域3结合配体。

Iwabuchi等人, 1994, 美国国家科学院学报 91: 6098-6102描述了p53结合蛋白质。

Takahashi等人, 1994, 细胞 76: 969-976描述了作为编程性细胞死亡因子的fas。

Goodson等人, 1994, 美国国家科学院学报 91: 7129-7133描述了用噬菌体显示文库获得的尿激酶受体拮抗物。

Scharf等人, 1995, 生物化学与生物物理学研究通讯 (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 209: 1018-1025描述了使用生物传感器对硝酸还原酶的电化学研究。

Abrams和Zhao, 1995, 生物化学杂志 270: 333-339描述了src同源结构域3。

Ivanenkov等人, 1995, 生物化学杂志 270:14651-14658描述了随机肽库。

Takenaka等人, 1995, 生物化学杂志 270:19839-19844描述了噬菌体显示文库。

Martens等人, 1995, 生物化学杂志 270:21129-21136描述了随机肽

库。

Dyson和Murray, 1995, 美国国家科学院学报 92: 2194-2198描述了随机肽库。

Chen和Sudol, 1995, 美国国家科学院学报 92:7819-7823描述了src同源结构域3。

Nagata和Golstein, 1995, 科学 267:1449-1456描述了作为编程性细胞死亡因子的fas。

Saksela等人, 1995, *EMBO J.* 14: 484-491描述了src同源结构域3。

Sudol 等人, 1995, *FEBS Lett.* 369: 67-71描述了src同源结构域3。

Weng等人, 1995, 分子细胞生物学 (*Molec. Cell. Biol.*) 15: 5627-5634描述了src同源结构域3。

Rickles等人, 1995, 美国国家科学院学报 92:10909-10913使用噬菌体显示文库描述了src同源结构域3结合配体。

Feng等人, 1995, 美国国家科学院学报 92:12408-2415描述了src同源结构域3。

Gold等人, 1995, 生物化学年鉴 (*Ann. Rev. Biochem.*) 64: 763-797 描述了aptamers。

Phizicky和Fields, 1995, 微生物学综述 (*Microbiol. Rev.*) 59: 94-123描述了检测和分析蛋白质-蛋白质相互作用的方法。

Adey和Kay, 1996, 基因 (*Gene*) 169:133-134描述了随机肽库。

Sparks等人, 1996, 美国国家科学院学报 93:1540-1543描述了src同源结构域3片段。

Yanofsky等人, 1996, 美国国家科学院学报 93: 7381-7386描述了用重组肽库获得的高亲和力白细胞介素I型拮抗剂。

Wrighton等人, 1996, 科学 273: 458-463描述了从随机肽库分离的、作为促红细胞生成素模拟物的小肽。

Holmes等人, 1996, 科学 274:2089-2091描述了src 5H3 结构域。

Fang等人, 1996, 生物化学与生物物理学研究通讯 220: 53-56描述了用噬菌体显示文库获得的胰蛋白酶抑制剂。

Hahne等人, 1996, 科学 274: 1363-1366描述了作为编程性细胞死亡因子的fas。

Chan等人, 1996, EMBO J. 15:1045-1054描述了含功能上类似src 5H3结构域的结构域的形成素结合蛋白质。

### 发明概述

本发明提供了进行电化学分析的方法和装置, 用于检测生物结合对之间的结合。这些方法和装置可用于进行直接结合和竞争性结合实验, 其检测和分析能抑制生物结合对之间结合的化合物, 由此鉴定能与包含生物结合对的物种的生物活性部分相互作用的化合物。本发明的方法可用来对用作药物的生物活性化合物进行快速、高通量的筛选, 这些化合物与生物结合对的一种成分相互作用, 并因此干扰或影响其生物学功能。

在第一个方面, 本发明提供一种进行电化学测定的装置, 用于检测生物结合对的成分之间的结合。本发明的装置包括下列组分:

- 1.第一种电极, 其中该电极包含一种导电的或半导电的材料, 并且该电极具有用多孔的、亲水的、聚合层包被的表面, 生物结合对的第一种成分固定于该层上;

- 2.第二种参比电极, 其包含一种与电解质水溶液接触的导电金属;

- 3.第三种辅助电极, 其包含一种导电金属

其中每种电极与稳压器导电连接, 该装置进一步包括:

- 4.一种包含电解质溶液的反应室, 其中每种电极与其电化学接触, 该溶液进一步包含

- 5.一种电化学介质, 其包含在对电极施加电势的条件下能参与与该电极、特别是第一种电极的还原/氧化反应的化学物种, 该溶液进一步包含

- 6.生物结合对的第二种成分, 其中此第二种成分用一种化学物种电化学标记, 在对电极施加电势的条件下该化学物种能参与与电化学介质的还原/氧化反应。

在该装置的应用中, 在生物结合对的第二种成分与生物结合对的第一种成分结合的条件下, 当对电极施加电势时, 产生电流。

在优选的实施方案中，电化学测定是循环伏安法或计时安培分析法。

在一种优选实施方案中，生物结合对的第一种成分是受体蛋白质或其配体结合片段。在另一种优选实施方案中，生物结合对的第一种成分是抗体蛋白质或其抗原结合片段。在又一种优选实施方案中，生物结合对的第一种成分是与第二种蛋白质特异性结合的第一种蛋白质或其片段。

在优选的实施方案中，生物结合对的第二种成分是配体、抗原或蛋白质，它可与固定于本发明装置第一种电极上的生物结合对第一种成分结合。本领域的一名普通技术人员应知晓到生物结合对的第一种和第二种成分（例如，受体/配体，抗原/抗体，等等）的适当选择。

在本发明的特别优选的实施方案中，生物结合对的第二种成分是生物结合对第一种成分的替代配体，其具有约50皮摩尔（pM）到约0.5mM、更优选地约1纳摩尔（nM）到约100微摩尔（μM）、最优选地约10nM到约10μM的结合亲和力。优选地该替代配体被电化学标记，更优选地用钌化合物标记。

本发明的装置也包括这样的实施方案，其中该装置进一步包括多重本发明的每种电极和反应室，其中每一反应室包含一种电解质，并与装置中多重电极中三种电极的每一种电化学接触，与每一反应室电化学接触的每种电极与稳压器电连接。

在优选的实施方案中，生物结合对的第二种成分用钌电化学标记。在优选的实施方案中，电化学介质是钌化合物。在特别优选的实施方案中，用作电化学介质或电化学标记物的钌化合物是五胺钌化合物如  $\{\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}\}\text{Cl}$ 、 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  或  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{H}_2\text{O})^{2+}$ 。

本发明也提供一种包含导电或半导体材料的电极，其中该电极具有用多孔的、亲水的、聚合层包被的表面，生物结合对的第一种成分固定于该层上，以供本发明的装置使用或用来进行任何其它的电化学测定。

本发明也提供一种试剂盒，用来制备本发明的装置的第一种电极。本发明提供的这种试剂盒包括含导电或半导体材料的电极、生物结合对的第一种成分、在电极表面上制备多孔的亲水的聚合层的试剂、以及将生物结合对的第一种成分固定于电极表面上多孔的亲水的聚合层内的试剂。

因此，本发明也提供用在此提供的或以其它方式提供的试剂盒制备本发明装置的第一种电极的方法，这些方法包括下列步骤：

- a)提供一种包含导电或半导体材料的电极；
- b)在电极表面上制备多孔的、亲水的、聚合层；以及
- c)将生物结合对的第一种成分固定于电极表面上多孔的、亲水的、聚合层内。

本发明也提供一种试剂盒，其包含用在此所述的固定蛋白质包被的第一种电极，该蛋白质是生物结合对的第一种成分，或者该试剂盒包含制备该电极的试剂，其中该试剂包含待固定于电极上的生物结合对的第一种成分、优选地蛋白质，因而包含一种电化学靶。作为本发明试剂盒实施方案的一种组分，也提供了至少一种生物结合对的第二种成分，优选地包括一种替代配体，该配体具有对生物结合对第一种成分的结合特异性，其特征是约50皮摩尔（pM）到约0.5mM、更优选地约1纳摩尔（nM）到约100微摩尔（ $\mu$ M）、最优选地约10nM到约10 $\mu$ M的解离常数（ $K_d$ ），因而包含一种电化学探针。在本发明试剂盒的某些实施方案中，电化学标记的实施方案中提供该生物结合对的第二种成分。在本发明试剂盒的某些其它实施方案中，使用者提供了生物结合对的第二种成分，以及包括用于制备电化学标记的实施方案的电化学标记物的试剂。该试剂盒也提供电化学介质，该介质包含在对电极施加电势的条件下能参与与该电极的还原/氧化反应的化学物种。任选地和便利地，该试剂盒也提供大量与电化学标记的探针电化学匹配的电化学介质，根据本发明的方法这些介质是有用的。本发明试剂盒的其它和任选的组分包括缓冲液、试剂和在此所述的电极。

也提供了使用本发明的装置的方法。在第一种实施方案中，提供了一种方法，它使用根据本发明此方面的装置，检测电化学标记的生物结合对第二种成分与固定于电极上的生物结合对第一种成分的结合。在该实施方案中，其方法包括步骤：

- a)提供第一种反应室，它与本发明的装置的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分，并提供第二种反应室，它与本发明的装置的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含



固定于其上的生物结合对的第一种成分，每种电极与稳压器电连接；

其中，第一种反应室包含本发明的装置的电化学介质和电化学标记的生物结合对的第二种成分，该成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，其中，第二种反应室包含本发明的装置的电化学介质和电化学标记的物种，该物种不与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合；在其它实施方案中，在第一种和第二种反应室中都存在电化学标记的生物结合对的第二种成分，它可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，但在第二种反应室中电极上固定的第一种成分不与电化学标记的第二种成分特异性结合。该方法进一步包括下列步骤：

b)在本发明装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电化学测定，以使该装置的电极中产生电流；和

c)将第一种反应室中电化学测定所产生的电流与第二种反应室中电化学测定所产生的电流相比较；

其中，根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流，检测电化学标记的生物结合对第二种成分与固定的生物结合对第一种成分的结合。当在每个室的电极之间施加电势时，通过对每一反应室中产生的电流的比较检测生物结合对的成分之间的特异相互作用。在第一种反应室中生物结合对的第一种和第二种成分的特异性结合在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更高的电流输出，在该室中生物结合对的第二种成分与固定于电极上的非相关物种之间没有特异的相互作用，或者在第二种反应室中电极上固定的生物结合对第一种成分与第二种反应室所含的非相关的、电化学标记的物种之间没有特异的相互作用。

在本发明的方法的第二种实施方案中，提供了一种方法，它使用根据本发明此方面的装置鉴定电化学标记的生物结合对第二种成分与固定于电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂。在该实施方案中，其方法包括步骤：

a)提供第一种反应室，它与本发明的装置的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分，并提供第二种反应室，它与本发明的装置的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含

固定于其上的生物结合对的第一种成分，每种电极与稳压器电连接；

其中，每一反应室包含本发明的装置的电化学介质和电化学标记的生物结合对的第二种成分，该成分与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，其中，第二种反应室进一步包含生物结合对第二种成分的结合的抑制剂，该第二种成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合。该方法进一步包括下列步骤：

b)在本发明装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电化学测定，以使该装置的电极中产生电流；和

c)将第一种反应室中电化学测定所产生的电流与第二种反应室中电化学测定所产生的电流相比较

其中，根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流，鉴定电化学标记的生物结合对第二种成分与固定的生物结合对第一种成分的结合的抑制剂。当在反应室电极之间施加电势时，通过对每一反应室中产生的电流的比较检测生物结合对的成分之间的特异相互作用。然后，将反应室中生物结合对的第一种和第二种成分特异性结合所产生的电流的水平与在特异性结合抑制剂存在下该室中产生的电流的水平与量相比较，其差异与生物结合对第一种成分的抑制剂的浓度和/或结合亲和力有关。

在本发明的方法的第三种实施方案中，提供了一种方法，它使用本发明此方面的装置，为了得到电化学标记的生物结合对第二种成分与固定于电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂而筛选复杂化学混合物，该方法包括步骤：

a) 提供第一种反应室，它与本发明的装置的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分，并提供第二种反应室，它与本发明的装置的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含固定于其上的生物结合对的第一种成分，每种电极与稳压器电连接；

其中，每一反应室包含本发明的装置的电化学介质和电化学标记的生物结合对的第二种成分，该成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，其中第二种反应室进一步包含一部分复杂混合物，该混合物包含

生物结合对第二种成分的结合的抑制剂，该第二种成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合。此方法进一步包括下列步骤：

b) 在本发明装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电化学测定，以使该装置的电极中产生电流；和

c) 将第一种反应室中电化学测定所产生的电流与第二种反应室中电化学测定所产生的电流相比较

其中，根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流鉴定复杂混合物，该混合物含有电化学标记的生物结合对第二种成分与固定的生物结合对第一种成分结合的抑制剂。当在该室电极之间施加电势时，通过对每一反应室中产生的电流的比较，检测生物结合对的成分之间的特异相互作用。然后将反应室中生物结合对的第一种和第二种成分特异性结合所产生的电流的水平量和在复杂化学混合物存在下该室中产生的电流的水平量相比较，该混合物包含特异性结合的抑制剂。

在本发明此实施方案的另一面，该方法用来分离和鉴定生物结合对第二种成分与固定于本发明装置第一种电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂。在此实施方案中，其方法包括下列附加步骤：

d) 化学分级分离复杂混合物，该混合物含有生物结合对的第二种成分与固定于第一种电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂，以产生分级分离的亚混合物(Submixture)；和

e) 对每种分级分离的亚混合物进行该方法的步骤(a)到(c)，以鉴定含有生物结合对结合的抑制剂的亚混合物。

在此方面，应当认识到对化学分级分离的亚混合物能重复进行步骤(a)到(e)，以产生包含逐渐纯化的抑制剂制剂的亚混合物。在优选的实施方案中，化学分级分离包括化学、生物化学、物理和免疫学方法，用于抑制剂的化学或生物化学物种的分级分离。

在本发明每种方法的优选实施方案中，生物结合对的第二种成分是电化学标记的替代配体，其特征是对于生物结合对的第一种成分的解离常数( $K_d$ )为约50皮摩尔(pM)到约0.5mM、更优选地约1纳摩尔(nM)到约100微摩尔( $\mu$ M)、最优选地约10nM到约10 $\mu$ M。

在本发明的第二个方面，提供了进行电化学测定的另一种装置，用于检测生物结合对的成分之间的结合。在本发明的此方面，该装置包括下列组分：

1. 第一种电极，其中该电极包含导电的或半导电的材料，并且该电极具有用多孔的、亲水的、聚合层包被的表面，其中生物结合对的第一种成分和一种电化学介质固定于该层上，该电化学介质中包含在对电极施加电势的条件下能参与与该电极的还原/氧化反应的化学物种，
2. 第二种参比电极，其包含一种与电解质水溶液接触的导电金属；
3. 第三种辅助电极，其包含一种导电金属

其中，每种电极与稳压器电连接，该装置进一步包括：

4. 一种包含电解质溶液的反应室，其中每种电极与其电化学接触，该溶液进一步包含

5. 生物结合对的第二种成分，其中此第二种成分用一种化学物种电化学标记，在对电极施加电势的条件下该化学物种能参与与电化学介质的还原/氧化反应。

在该装置的应用中，在生物结合对的第二种成分与生物结合对的第一种成分结合的条件下，当对电极施加电势时，产生电流。

在优选的实施方案中，电化学测定是循环伏安法或计时安培分析法。

在一种优选实施方案中，生物结合对的第一种成分是受体蛋白质或其配体结合片段。在另一种优选实施方案中，生物结合对的第一种成分是抗体蛋白质或其抗原结合片段。在又一种优选实施方案中，生物结合对的第一种成分是与第二种蛋白质特异性结合的第一种蛋白质或其片段。

在优选的实施方案中，生物结合对的第二种成分是配体、抗原或蛋白质，它可与固定于本发明装置的第一种电极上的生物结合对第一种成分相结合。本领域的一名普通技术人员知晓生物结合对的第一种和第二种成分（例如，受体/配体，抗原/抗体，等等）的适当选择。

在本发明的特别优选的实施方案中，生物结合对的第二种成分是生物结合对第一种成分的替代配体，其具有约50皮摩尔（pM）到约0.5mM、

更优选地约1纳摩尔 (nM) 到约100微摩尔 ( $\mu\text{M}$ )、最优选地约10nM到约10 $\mu\text{M}$ 的结合亲和力。优选地该替代配体被电化学标记, 更优选地用钌化合物标记。

本发明的装置也包括这样的实施方案, 其中该装置进一步包括多种本发明的每种电极和反应室, 每一反应室包含一种电解质, 并与装置中多种电极中三种电极的每一种电化学接触, 与每一反应室电化学接触的每种电极与稳压器电连接。

在优选的实施方案中, 生物结合对的第二种成分用钌电化学标记。在优选的实施方案中, 电化学介质是钌化合物或钺化合物。在特别优选的实施方案中, 用作电化学介质或电化学标记物的钌化合物是五胺钌化合物如  $\{\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}\}\text{Cl}$ 、 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  或  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{H}_2\text{O})^{2+}$ 。在优选的实施方案中, 固定于本发明装置的第一种电极上的电化学介质是钺二吡啶化合物。

在本发明此实施方案的应用中, 通过电流的观察检测生物结合对的成分之间的特异性结合相互作用。电流是在一定的电极电势下产生的, 该电势足以激活 (氧化或还原) 固定的电化学介质和附着于生物结合对的第二种成分的电化学标记物。在所述的适当电极电势下, 氧化的 (或还原的) 电化学介质被电化学标记物还原 (氧化)。此电极电势允许电化学介质/电化学标记物对的氧化/还原的循环, 由此产生电流。在本发明的实施中, 将生物结合对的成分特异性结合所产生的电流量与加入生物结合对第二种成分之前产生的电流量相比较, 或者与加入已知的非结合成分后产生的电流量 (由此提供阴性对照) 相比较。结合特异性的确定方法是将该电流与在已知结合抑制剂存在下产生的电流相比较。能确定结合抑制、激活或竞争的程度、能力或速率的其它比较, 方法是在推定的抑制剂、竞争剂、激活剂或药物主要候选物存在下产生的电流量度的分析, 本领域的技术人员将理解进行这些比较的详细细节, 并在以下更完全地公开。

本发明也提供一种包含导电或半导体材料的电极, 其中该电极具有用多孔的、亲水的、聚合层包被的表面, 生物结合对的第一种成分和电化学介质固定于该层上, 以供本发明的装置使用或用来进行任何其它的电化学测定, 该电化学介质中包含在对电极施加电势的条件下能参与与电极的还

原/氧化反应的化学物种。

本发明也提供一种试剂盒，用于制备本发明的装置的第一种电极。本发明提供的这种试剂盒包括含导电或半导体材料的电极、生物结合对的第一种成分、在电极表面上制备多孔的亲水的聚合层的试剂、电化学介质以及将生物结合对的第一种成分和电化学介质固定于电极表面上多孔的亲水的聚合层内的试剂。

因此，本发明也提供一种方法，它使用在此提供或以其它方式提供的试剂盒制备本发明装置的第一种电极。这些方法包括下列步骤：

- a) 提供一种包含导电或半导体材料的电极；
- b) 在电极表面上制备多孔的、亲水的、聚合层；以及
- c) 将生物结合对的第一种成分和电化学介质固定于电极表面上多孔的、亲水的、聚合层内。

本发明也提供一种试剂盒，其包含用在此所述的固定的蛋白质包被的第一种电极和电化学介质，该蛋白质是生物结合对的第一种成分，或者该试剂盒包含用于制备该电极的试剂和一种电化学介质，其中该试剂包括固定于电极上的生物结合对的第一种成分，优选地蛋白质，因而包含一种电化学靶。作为本发明试剂盒实施方案的一种组分，也提供了至少一种生物结合对的第二种成分，优选地包括一种替代配体，该配体具有对生物结合对第一种成分的结合特异性，其特征是约50皮摩尔（pM）到约0.5mM、更优选地约1纳摩尔（nM）到约100微摩尔（ $\mu$ M）、最优选地约10nM到约10 $\mu$ M的解离常数（ $K_d$ ），因而包含一种电化学探针。在本发明试剂盒的某些实施方案中，电化学标记的实施方案中提供了该生物结合对的第二种成分。在本发明试剂盒的某些其它实施方案中，使用者提供了生物结合对的第二种成分，并提供了包括用于制备电化学标记实施方案的电化学标记物的试剂。任选地和便利地，该试剂盒也提供了大量与电化学标记的探针电化学匹配的电化学介质，根据本发明的方法这些介质是有用的。本发明试剂盒的其它和任选的组分包括缓冲液、试剂和在此所述的电极。

也提供了使用本发明的装置的方法。在第一种实施方案中，提供了一种方法，它使用根据本发明此方面的装置，检测电化学标记的生物结合对

第二种成分与固定于电极上的生物结合对第一种成分的结合。在该实施方案中，其方法包括步骤：

- a) 提供第一种反应室，它与本发明的装置的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含生物结合对的第一种成分和一种电化学介质，该电化学介质包含在对其所固定的电极施加电势的条件下能参与与电极的还原/氧化反应的化学物种，并提供第二种反应室，它与本发明的装置的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含生物结合对的第一种成分和一种电化学介质，该电化学介质包含在对其所固定的电极施加电势的条件下能参与与电极的还原/氧化反应的化学物种，该装置的每种电极与稳压器电连接；

其中，第一种反应室包含电化学标记的生物结合对的第二种成分，该成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，其中第二种反应室包含电化学标记的物种，该物种不与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合；在其它实施方案中，在第一种和第二种反应室中都存在电化学标记的生物结合对的第二种成分，它可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，但第二种反应室中在电极上固定的第一种成分不与电化学标记的第二种成分特异性结合。该方法进一步包括下列步骤：

- b) 在本发明装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电化学测定，以使该装置的电极中产生电流；和

- c) 将第一种反应室中电化学测定所产生的电流与第二种反应室中电化学测定所产生的电流相比较

其中，根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流，检测电化学标记的生物结合对第二种成分与固定的生物结合对第一种成分的结合。当在每个室的电极之间施加电势时，通过对每一反应室中产生的电流的比较检测生物结合对的成分之间的特异相互作用。在第一种反应室中生物结合对的第一种和第二种成分的特异性结合，在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更高的电流输出，在该室中生物结合对的第二种成分与固定于电极上的非相关物种之间没有特异的相互作用，或者在固定的生物结合对第一种成分与第二种反应室所含的非相关的、电化学标记的物种

之间没有特异的相互作用。

在本发明此方面的方法的第二种实施方案中，提供了一种方法，它使用根据本发明的装置鉴定电化学标记的生物结合对第二种成分与固定于电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂。在该实施方案中，其方法包括步骤：

- a) 提供第一种反应室，它与本发明的装置的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含生物结合对的第一种成分和一种电化学介质，该电化学介质包含在对其所固定的电极施加电势的条件下能参与与电极的还原/氧化反应的化学物种，并提供第二种反应室，它与本发明的装置的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含生物结合对的第一种成分和一种电化学介质，该电化学介质包含在对其所固定的电极施加电势的条件下能参与与电极的还原/氧化反应的化学物种，该装置的每种电极与稳压器电连接；

其中，每一种反应室包含电化学标记的生物结合对的第二种成分，该成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，其中，第二种反应室进一步包含生物结合对第二种成分的结合的抑制剂，该第二种成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合。该方法进一步包括下列步骤：

- b) 在本发明装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电化学测定，以使该装置的电极中产生电流；和
- c) 将第一种反应室中电化学测定所产生的电流与第二种反应室中电化学测定所产生的电流相比较

其中，根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流，鉴定电化学标记的生物结合对第二种成分与固定的生物结合对第一种成分结合的抑制剂。当在该室电极之间施加电势时，通过对每一反应室中产生的电流的比较，检测生物结合对的成分之间的特异相互作用。然后，将反应室中生物结合对的第一种和第二种成分特异性结合所产生的电流的水平 and 量与在特异性结合的抑制剂存在下该室中产生的电流的水平 and 量相比较，其差异与生物结合对第一种成分的抑制剂的浓度和/或结合亲和力有关。



在本发明此方面的方法的第三种实施方案中，提供了一种方法，它使用本发明的装置，为了得到电化学标记的生物结合对第二种成分与固定于电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂而筛选复杂化学混合物。该方法包括步骤：

- a) 提供第一种反应室，它与本发明的装置的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含生物结合对的第一种成分和一种电化学介质，该电化学介质包含在对其所固定的电极施加电势的条件下能参与与电极的还原/氧化反应的化学物种，并提供第二种反应室，它与本发明的装置的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含生物结合对的第一种成分和一种电化学介质，该电化学介质包含在对其所固定的电极施加电势的条件下能参与与电极的还原/氧化反应的化学物种，该装置的每种电极与稳压器电连接；

其中，每种反应室包含电化学标记的生物结合对的第二种成分，该成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，其中，第二种反应室进一步包含一部分复杂混合物，该混合物包含生物结合对第二种成分的结合的抑制剂，该第二种成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合。此方法进一步包括下列步骤：

- b) 在本发明装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电化学测定，以使该装置的电极中产生电流；和
- c) 将第一种反应室中电化学测定所产生的电流与第二种反应室中电化学测定所产生的电流相比较

其中，根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流鉴定复杂混合物，该混合物含有电化学标记的生物结合对第二种成分与固定的生物结合对第一种成分结合的抑制剂。当在该室电极之间施加电势时，通过对每一反应室中产生的电流的比较，检测生物结合对的成分之间的特异相互作用。然后，将反应室中生物结合对的第一种和第二种成分特异性结合所产生的电流的水平 and 量与在复杂化学混合物存在下该室中产生的电流的水平 and 量相比较，该混合物包含特异性结合的抑制剂。

在本发明此实施方案的另一方面中，该方法用来分离和鉴定生物结合

对第二种成分与固定于本发明装置第一种电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂。在此实施方案中，其方法包括下列附加步骤：

d) 化学分级分离复杂混合物，该混合物含有生物结合对第二种成分与固定于第一种电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂，以产生分级分离的亚混合物；和

e) 对每种分级分离的亚混合物进行该方法的步骤(a)到(c)，以鉴定含有生物结合对结合的抑制剂的亚混合物。

在此方面，应当认识到对化学分级分离的亚混合物能重复进行步骤(a)到(e)，以产生包含逐渐纯化的抑制剂制剂的亚混合物。在优选的实施方案中，化学分级分离包括化学、生物化学、物理和免疫学方法，用于抑制剂的化学或生物化学物种的分级分离。

在本发明每种方法的优选实施方案中，生物结合对的第二种成分是电化学标记的替代配体，其特征是对于生物结合对第一种成分的解离常数( $K_d$ )为约50皮摩尔(pM)到约0.5mM、更优选地约1纳摩尔(nM)到约100微摩尔( $\mu$ M)、最优选地约10nM到约10 $\mu$ M。

在本发明的第三个方面，还提供了进行电化学测定的另一种装置，用于检测生物结合对的成分之间的结合。在本发明的此方面，该装置包括下列组分：

1. 第一种电极，其中该电极包含导电的或半导电的材料，并且该电极具有用多孔的、亲水的、聚合层包被的表面，其中生物结合对的第一种成分和一种电化学介质固定于该层上，该电化学介质包含在对该电极施加电势的条件下能参与与该电极的还原/氧化反应的化学物种，
2. 第二种参比电极，其包含一种与电解质水溶液接触的导电金属；
3. 第三种辅助电极，其包含一种导电金属，

其中每种电极与稳压器电连接，该装置进一步包括：

4. 一种包含电解质溶液的反应室，其中每种电极与其电化学接触，该溶液进一步包含

5. 生物结合对的第二种成分，其中此第二种成分与一种电化学催化剂

相结合，在对电极施加电势的条件下，该催化剂能参与与电化学介质的还原/氧化反应，其中反应室中的电解质溶液进一步包含该电化学催化剂的底物。

在该装置的应用中，在可与生物结合对第二种成分结合的电化学催化剂的底物存在下，在生物结合对的第二种成分可与生物结合对的第一种成分结合的条件下，当对电极施加电势时，在该装置中产生电流。

在优选的实施方案中，电化学测定是循环伏安法或计时安培分析法。

在一种优选实施方案中，生物结合对的第一种成分是受体蛋白质或其配体结合片段。在另一种优选实施方案中，生物结合对的第一种成分是抗体蛋白质或其抗原结合片段。在再另一种优选实施方案中，生物结合对的第一种成分是与第二种蛋白质特异性结合的第一种蛋白质或其片段。

在优选的实施方案中，生物结合对的第二种成分是配体、抗原或蛋白质，它可与固定于本发明装置的第一种电极上的生物结合对第一种成分相结合。本领域的一名普通技术人员知晓生物结合对的第一种和第二种成分（例如，受体/配体，抗原/抗体，等等）的适当选择。

在本发明的特别优选的实施方案中，生物结合对的第二种成分是生物结合对第一种成分的替代配体，其具有约50皮摩尔（pM）到约0.5mM、更优选地约1纳摩尔（nM）到约100微摩尔（ $\mu$ M）、最优选地约10nM到约10 $\mu$ M的结合亲和力。优选地该替代配体用电化学催化剂标记，更优选地用氧化还原酶如辣根过氧化物酶标记。

本发明的装置也包括这样的实施方案，其中该装置进一步包括多重本发明的每种电极和反应室，其中每一反应室包含一种电解质，并与装置中多重电极中三种电极的每一种电化学接触，与每一反应室电化学接触的每种电极与稳压器电连接。

如本发明此方面所提供的，生物结合对的第二种成分用电化学催化剂标记。在优选的实施方案中，电化学催化剂是一种酶，最优选地是一种氧化还原酶，它通过氧化/还原机制将底物催化为产物，其中结合的辅因子的酶上的任一个功能团参与氧化/还原循环。在特别优选的实施方案中，电化学催化剂是过氧化物酶，例如辣根过氧化物酶。

在优选的实施方案中，固定于本发明装置的第一种电极上的电化学介质是钺化合物，更优选地是钺二吡啶化合物。

在本发明此实施方案的应用中，通过电流的观察检测生物结合对的成分之间的特异性结合相互作用。本发明的装置包括一种电极，其中电化学介质和生物结合对的第一种成分都固定于包被该电极的聚合层内。该装置也包括与物种、优选地与酶化学连接的生物结合对的第二种成分，它能被固定的介质所氧化或还原，也能催化地氧化或还原存在于溶液中的第三种物种；在电化学催化剂是酶的实施方案中，第三种物种是该酶的底物。然而，这第三种物种不能被电极上存在的固定的介质物种直接氧化或还原。在本发明的实施方案的应用中，通过电流的观察检测生物结合对的成分之间的特异性结合相互作用。电流是在一定的电极电势下产生的，该电势足以激活（氧化或还原）固定的电化学介质和附着于生物结合对第二种成分的电化学催化剂。在所述的适当电极电势下，氧化的（或还原的）电化学介质被电化学催化剂所还原（氧化），由此为其底物激活催化剂。当底物被消耗后，电极电势允许电化学介质/电化学催化剂对的氧化/还原循环，由此产生与电化学催化剂对底物的催化有关的电流。在本发明的实施中，将生物结合对的成分特异性结合所产生的电流量与加入生物结合对第二种成分之前产生的电流量相比较，或者与加入已知的非结合成分后产生的电流量（由此提供阴性对照）相比较。结合特异性的确定方法是将该电流与在已知结合抑制剂存在下产生的电流相比较。能确定结合抑制、激活或竞争的程度、能力或速率的其它比较，方法是在推定的抑制剂、竞争剂、激活剂或药物主要候选物存在下产生的电流量度的分析，本领域的技术人员将理解进行这些比较的详细细节，并在以下更完全地公开。

本发明此方面也提供一种包含导电或半导体材料的电极，其中该电极具有用多孔的、亲水的、聚合层包被的表面，生物结合对的第一种成分和一种电化学介质固定于该层上，以供本发明的装置使用或用来进行任何其它的电化学测定，该电化学介质包含在对电极施加电势的条件下能参与与电极的还原/氧化反应的化学物种。

本发明也提供一种试剂盒，用于制备本发明的装置的第一种电极。本

发明提供的这种试剂盒包括含导电或半导体材料的电极、生物结合对的第一种成分、在电极表面上制备多孔的亲水的聚合层的试剂、电化学介质以及将生物结合对的第一种成分和电化学介质固定于电极表面上多孔的、亲水的、聚合层内的试剂。

因此，本发明也提供一种方法，它使用在此提供或以其它方式提供的试剂盒制备本发明的装置的第一种电极，这些方法包括下列步骤：

- a) 提供一种包含导电或半导体材料的电极；
- b) 在电极表面上制备多孔的、亲水的、聚合层；以及
- c) 将生物结合对的第一种成分和电化学介质固定于电极表面上多孔的、亲水的、聚合层内。

本发明也提供一种试剂盒，其包含用在此所述的固定的蛋白质包被的第一种电极和一种电化学介质，该蛋白质是生物结合对的第一种成分，或者该试剂盒包含制备该电极的试剂和一种电化学介质，其中该试剂包含固定于电极上的生物结合对的第一种成分、优选地蛋白质，因而包含一种电化学靶。作为本发明试剂盒实施方案的一种组分，也提供了至少一种生物结合对的第二种成分，优选地包括一种替代配体，该配体具有对生物结合对的第一种成分的结合特异性，其特征是约50皮摩尔（pM）到约0.5mM、更优选地约1纳摩尔（nM）到约100微摩尔（ $\mu$ M）、最优选地约10nM到约10 $\mu$ M的解离常数（ $K_d$ ），因而包含一种电化学探针。在本发明试剂盒的某些实施方案中，生物结合对的第二种成分与电化学催化剂相连接。在本发明试剂盒的某些其它实施方案中，使用者提供了生物结合对的第二种成分，以及包含用于制备偶联电化学催化剂的第二种成分的电化学催化剂的试剂。任选地和便利地，该试剂盒也提供了大量与电化学催化剂电化学匹配的电化学介质，根据本发明的方法这些介质是有用的。本发明试剂盒的其它和任选的组分包括缓冲液、试剂和在此所述的电极。

也提供了使用本发明的装置的方法。在第一种实施方案中，提供了一种方法，它使用根据本发明此方面的装置检测电化学标记的生物结合对第二种成分与固定于电极上的生物结合对第一种成分的结合。在该实施方案中，其方法包括步骤：

- a) 提供第一种反应室，它与本发明的装置的每种电极电学接触，其中第一种电极包含生物结合对的第一种成分和一种电学介质，该电学介质包含在对其所固定的电极施加电势的条件下能参与与电极的还原/氧化反应的化学物种，并提供第二种反应室，它与本发明的装置的每种电极电学接触，其中第一种电极包含生物结合对的第一种成分和一种电学介质，该电学介质包含在对其所固定的电极施加电势的条件下能参与与电极的还原/氧化反应的化学物种，该装置的每种电极与稳压器电连接；

其中，第一种反应室包含与电学催化剂结合的生物结合对的第二种成分，该成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，其中，第二种反应室包含与电学催化剂结合的物种，该物种不与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，每种反应室进一步包括该电学催化剂的底物；在其它实施方案中，在第一种和第二种反应室中都有生物结合对的第二种成分，它可与结合电学催化剂的固定的生物结合对第一种成分特异性结合，但第二种反应室中在电极上固定的第一种成分不与偶联电学催化剂的第二种成分特异性结合。该方法进一步包括下列步骤：

- b) 在本发明装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电学测定，以使该装置的电极中产生电流；和

- c) 将第一种反应室中电学测定所产生的电流与第二种反应室中电学测定所产生的电流相比较

其中，根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流，检测电学标记的生物结合对第二种成分与固定的生物结合对第一种成分的结合。当在每个室的电极之间施加电势时，通过对每一反应室中产生的电流的比较，检测生物结合对的成分之间的特异相互作用。在第一种反应室中生物结合对的第一种和第二种成分的特异性结合，在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更高的电流输出，该室中生物结合对的第二种成分与固定于电极上的非相关物种之间没有特异的相互作用，或者在固定的生物结合对第一种成分与第二种反应室所含的非相关的、电学标记的物种之间没有特异的相互作用。

在本发明此方面的方法的第二种实施方案中，提供了一种方法，它使用根据本发明的装置，鉴定电化学标记的生物结合对的第二种成分与固定于电极上的生物结合对的第一种成分结合的抑制剂。在该实施方案中，其方法包括步骤：

- a) 提供第一种反应室，它与本发明的装置的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含生物结合对的第一种成分和一种电化学介质，该电化学介质包含在对其所固定的电极施加电势的条件下能参与与电极的还原/氧化反应的化学物种，并提供第二种反应室，它与本发明的装置的每种电极电化学接触，其中第一种电极包含生物结合对的第一种成分和一种电化学介质，该电化学介质包含在对其所固定的电极施加电势的条件下能参与与电极的还原/氧化反应的化学物种，该装置的每种电极与稳压器电连接；

其中，每种反应室包含与电化学催化剂结合的生物结合对的第二种成分，该成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合，并且包含该电化学催化剂的底物，其中第二种反应室进一步包含生物结合对第二种成分的结合的抑制剂，该第二种成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合。该方法进一步包括下列步骤：

- b) 在本发明装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电化学测定，以使该装置的电极中产生电流；和

- c) 将第一种反应室中电化学测定所产生的电流与第二种反应室中电化学测定所产生的电流相比较

其中，根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流，鉴定电化学标记的生物结合对第二种成分与固定的生物结合对第一种成分的结合的抑制剂。当在该室电极之间施加电势时，通过对反应室中产生的电流的比较，检测生物结合对的成分之间的特异相互作用。然后，将反应室中生物结合对的第一种和第二种成分特异性结合所产生的电流的水平 and 量与在特异性结合的抑制剂存在下该室中产生的电流的水平 and 量相比较。

在本发明此方面的方法的第三种实施方案中，提供了一种方法，它使用本发明的装置，为了得到电化学标记的生物结合对第二种成分与固定于

电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂而筛选复杂化学混合物。这些方法包括步骤:

- a) 提供第一种反应室, 它与本发明的装置的每种电极电学接触, 其中第一种电极包含生物结合对的第一种成分和一种电学介质, 该电学介质包含在对其所固定的电极施加电势的条件下能参与与电极的还原/氧化反应的化学物种, 并提供第二种反应室, 它与本发明的装置的每种电极电学接触, 其中第一种电极包含生物结合对的第一种成分和一种电学介质, 该电学介质包含在对其所固定的电极施加电势的条件下能参与与电极的还原/氧化反应的化学物种, 该装置的每种电极与稳压器电连接;

其中, 每种反应室包含该电学催化剂的底物和与电学催化剂结合的生物结合对的第二种成分, 该成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合, 其中第二种反应室进一步包含一部分复杂混合物, 该混合物包含生物结合对第二种成分的结合的抑制剂, 该第二种成分可与固定的生物结合对的第一种成分特异性结合。此方法进一步包括下列步骤:

- b) 在本发明装置的第一种和第二种反应室的每一个中进行电学测定, 以使该装置的电极中产生电流; 和

- c) 将第一种反应室中电学测定所产生的电流与第二种反应室中电学测定所产生的电流相比较

其中, 根据在第一种反应室中比在第二种反应室中产生更大电流鉴定复杂混合物, 该混合物含有电学标记的生物结合对第二种成分与固定的生物结合对第一种成分结合的抑制剂。当在该室电极之间施加电势时, 通过对每一反应室中产生的电流的比较, 检测生物结合对的成分之间的特异相互作用。然后, 将反应室中生物结合对的第一种和第二种成分特异性结合所产生的电流的水平与在复杂化学混合物存在下该室中产生的电流的水平相比较, 该混合物包含特异性结合的抑制剂。

在本发明此实施方案的另一面中, 该方法用来分离和鉴定生物结合对的第二种成分与固定于本发明装置第一种电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂。在此实施方案中, 其方法包括下列附加步骤:



d) 化学分级分离复杂混合物, 该混合物含有生物结合对第二种成分与固定于第一种电极上的生物结合对第一种成分结合的抑制剂, 以产生分级分离的亚混合物; 和

e) 对每种分级分离的亚混合物进行该方法的步骤(a)到(c), 以鉴定含有生物结合对结合的抑制剂的亚混合物。

在此方面, 应当认识到对化学分级分离的亚混合物能重复进行步骤(a)到(e), 以产生包含逐渐纯化的抑制剂制剂的亚混合物。在优选的实施方案中, 化学分级分离包括化学、生物化学、物理和免疫学方法, 用于抑制剂的化学或生物化学物种的分级分离。

在本发明每种方法的优选实施方案中, 生物结合对的第二种成分是电化学标记的对于生物结合对第一种成分的替代配体, 其具有约50皮摩尔(pM)到约0.5mM、更优选地约1纳摩尔(nM)到约100微摩尔( $\mu$ M)、最优选地约10nM到约10 $\mu$ M的结合亲和力。

通过以下特定优选实施方案和权利要求书的更详细描述, 本发明的特别优选的实施方案显而易见。

#### 附图简述

图1说明本发明第一种电极的组分的排列, 它包括用活化的多聚体或自我装配的单层所包被的导电或半导电电极, 生物结合对的第一种成分即蛋白质靶固定于该层上, 它们与包含生物结合对第二种成分的电化学标记的肽相互作用。

图2说明使用GST-Src SH3结构域融合蛋白和电化学标记的SH3结构域特异性结合肽进行电化学分析的方案。

图3显示使用图2所示方案得出的循环伏安法的结果。

图4显示图3所示实验结果的循环伏安法输出的积分结果和数据处理结果。

图5是一个条形图, 显示与使用固定有单独GST的电极进行图2所示电化学反应相比, 使用固定有GST-Src SH3结构域融合蛋白的电极进行该反应中积分电流输出的差异。

图6显示电化学标记一种肽的化学反应图式，以及标记的肽与电化学介质的氧化还原相互作用。

图7说明循环伏安法的特征。

图8说明src靶蛋白与偶联辣根过氧化物酶的替代配体相结合后产生的电流。该图也显示加入非结合的替代配体后产生的电流。在300秒时加入过氧化氢，随后在600秒时加入替代配体。

图9显示在与图8相同的条件下，替代配体与酪氨酸RNA合成酶结合后测定的电流。

图10显示当已知抑制剂从酪氨酸RNA合成酶上置换替代配体时观察到的电流损耗。

图11显示同时加入替代配体和已知竞争剂酪氨酸RNA合成酶后的电流反应。

图12显示向与抑制剂预温育的酪氨酸RNA合成酶加入替代配体后的电流反应。

图13显示在渐增浓度的酪氨酸RNA合成酶竞争性抑制剂存在下，使用替代配体的电流反应的降低。

图14显示使用实施例11所述的竞争性抑制剂时，酪氨酸RNA合成酶竞争性抑制剂的浓度与电流反应的降低之间的关系图。

### 优选实施方案详述

本发明提供了装置和方法，用于检测生物结合对的成分之间的特异相互作用，尤其包括结合。对于本发明，术语“生物结合对”意在包括任何两种生物学衍生的或分离的分子，或特异相互作用的任何化学物种，它们以测定的至少50mM的解离常数的化学亲和力特异性结合。该生物结合对的定义中特别包括与其它蛋白质相互作用的蛋白质，包括其片段；蛋白质和肽；蛋白质和配体；蛋白质和辅因子；蛋白质和变构的或协同的调节剂；蛋白质和核酸；蛋白质和糖类；抗原和抗体；脂类，包括脂肪酸、三酰甘油和与蛋白质或肽相互作用的极性脂类；受体和配体，特别是细胞因子；病毒-受体对；酶和底物；以及酶和抑制剂。该定义也包括与生物结合对

的至少一种成分相互作用的任何化学化合物或混合物。本发明的生物结合对的成分意在包括天然发生的、合成的分子，或通过重组遗传方法或生物化学分离和提取方法制备的分子。生物结合对成分的合成实施方案被理解为，一般与至少一部分任何天然发生的类似物共有结构相似性，它们相类似或被构建成类似或模拟的。这些定义是非排它的和非限制的，意在包括能以规定的化学亲和力特异相互作用的任何两种生物或化学物种。

本发明的装置包括用多孔的、亲水的、聚合材料包被的第一种导电或半导电的电极。可用于制备本发明导电或半导电电极的材料非限制性实例包括：金属浸渗的玻璃，如加锡的氧化铟或加氟的氧化锡玻璃、金、碳或铂。可用作本发明第一种电极包被的材料实例包括：琼脂、琼脂糖、葡聚糖和修饰的葡聚糖、丙烯酰胺、吡咯和吡咯-糖类、聚苯乙烯、尼龙、硝化纤维素、聚酯薄膜、Nafion、聚乙烯、聚丙烯、聚吡咯、聚噻吩和聚苯胺。用取决于包被物种和导电或半导电电极材料之化学性质的方法制备本发明的第一种电极的包被。例如，包被电极表面的方法包括使用吡咯的电聚合作用或旋转铸造、蒸发或使用可溶支持物如聚苯乙烯、聚酯薄膜或Nafion的原位聚合作用。为耐受非结合的杂质而优化这些包被，例如通过调节其厚度。然后使用取决于电极包被材料性质的多种化学偶联技术将生物结合对的成分如蛋白质附着于电极上。例如，当电极包含金属氧化物上的氧化聚酯薄膜、碳或金、碳或金上的氧化聚苯乙烯、金上的链烷硫醇羧酸酯自装配单层（SAMS）、金属氧化物上的羧化SAMS、或含电聚合羧酸酯的单体时，碳二亚胺交联是有用的。另外，能通过任何上述方法或通过聚合物包被的被动吸收将抗生物素蛋白或链霉抗生物素附着于电极上，然后生物素偶联的靶蛋白质通过与抗生物素蛋白或链霉抗生物素的相互作用结合。另外，聚组氨酸标记的靶可以与具有能结合二价镍离子（ $\text{Ni}^{2+}$ ）的包被的电极相结合。对蛋白质和温度稳定性、结合配体的溶剂可及性及配体结合效率来选择和优化这些方法。

本发明的装置也提供生物结合对的第二种成分，其中该第二种成分被电化学标记。电化学标记物被定义为化学物种，一般阳离子包含如钨、钼或钴，当在该装置的反应室中的电极间施加电势时，它们能参与与电化学

介质和该装置的第一种电极的还原/氧化 (redox) 反应。对于包含肽的生物结合对的第二种成分, 无机复合物如  $\text{Ru}^{2+/3+}$ -胺复合物、二茂铁和铱-或钴-聚吡啶复合物通过组氨酸或半胱氨酸残基或在氨基末端附着于肽上。通过赖氨酸或半胱氨酸残基或在氨基末端偶联氧化还原活性的有机部分, 将氧化还原活性的有机分子如甲基紫精衍生物和醌附着于肽上。

这些氧化还原活性的有机和无机分子也被用作本发明装置的反应室的电解质溶液中的电化学介质, 籍此针对与所用的电化学标记物的电化学相容性而选择介质。针对电流敏感度、标记物的特异性和扩散至半导电电极包被的多聚体基质中的能力来优化电化学标记物和介质的组合的选择。

在本发明的实施中, 包含生物结合对第二种成分的优选化合物是特异性结合对第一种成分的“替代”配体。对于本发明, 术语“替代配体”意在定义一组生物学活性的化合物, 它们能与包含生物结合对第一种成分的任何规定的靶特异性结合。尽管该定义意在包括靶特别是靶蛋白的多种配体, 其包含生物结合对的第一种成分, 包括天然配体, 但本发明的替代配体优选地包括与靶蛋白特异性结合的配体, 其具有化学亲和力测定的解离常数 ( $K_d$ ) 约50皮摩尔 (pM) 到约0.5mM、更优选地约1纳摩尔 (nM) 到约100微摩尔 ( $\mu\text{M}$ )、最优选地约10nM到约10 $\mu\text{M}$ 的。这些替代配体是优选的, 因为它们以足够的亲和力结合, 在本发明装置第一种电极的表面上电化学标记物的浓度足以产生可实验检测的电流, 而同时结合亲和力弱得足以被竞争剂和抑制剂所置换, 所需的这些化合物浓度是经济的并且能在实验中达到。因此, 替代配体提供所需的特异性的程度和所需的易于解离的程度, 以使本发明的方法和装置能检测竞争剂物种的结合抑制。已鉴定了与肽结合的某些靶, 列于表I中。

在本发明的方法的实施中, 作为电化学标记的替代配体的生物结合对第二种成分包括但不限于肽、核酸、糖类和小分子。在用肽作为生物结合对第二种成分的本发明方法的实施方案中, 肽优选地来源于噬菌体显示组合肽库 (见共同拥有的和共同未决的美国专利申请系列号08/740,671, 1996年10月21日递交, 在此引入作为参考) 以及其它方法, 如在针(pin)或珠上制备的合成肽。仅包含天然发生的氨基酸的这些肽必须被电化学标记,

因为在作为电极固定靶的生物结合对第一种成分耐受的电压条件下，它们缺乏足够的氧化还原势能。包含本发明的装置和方法的电化学探针和靶的肽和蛋白质，其制备方法包括合成法（包括固相肽合成）、生物化学分离和修饰技术（包括部分蛋白酶解）、本领域的技术人员理解的重组遗传方法（见Sambrook等人，1990，《分子克隆》，第二版，Cold Spring Harbor Laboratory Press，纽约）。

有用的电化学标记法的一个实例是向肽序列内的组氨酸残基添加钌基团（ $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{OH}_2)_2^{2+}$ ）。另外，能将电化学标记物以合成后方式加入氨基端或羧基端，或加入半胱氨酸残基的活性侧链巯基、丝氨酸或苏氨酸残基的羟基（或糖类部分上）、或肽的赖氨酸残基的氨基上。另外，能使用“非天然”氨基酸（如D-氨基酸或氨基酸类似物如 $\epsilon$ -氨基己酸）的Fmoc衍生物，它们能在肽合成期间被掺入。

另外，多种非肽替代配体能适用于该电极系统。例如，与靶分子特异性结合的核酸（即RNA种类和DNA种类，包括聚核苷酸和寡核苷酸）能从组合核酸文库获得；这些分子被称为“aptamer”（在Gold等人，1995，生物化学年鉴，64：763中公开）。这些aptamer能用标记基团在3'或5'端电化学标记，或者在aptamer的体外产生期间通过不加区别的RNA或DNA聚合酶能将电化学标记基团结合的修饰的核苷酸三磷酸掺入寡核苷酸中。最后，某些小分子能以不破坏其结合活性的方式被电化学标记。例如，环AMP（cAMP）能被电化学标记而不减少其与蛋白激酶A的结合，由此提供了一种生物结合对，用于对影响cAMP与蛋白激酶A结合的化合物进行电化学分析。

可用于本发明的装置的电解质溶液包括具有生理相关离子强度（相当于大约0.15M NaCl）和中性pH的任何电解质溶液。本发明的装置可用的电解质溶液的非限制性实例包括磷酸缓冲盐溶液（PBS）、HEPES缓冲液和碳酸氢钠缓冲液。

表I. 已从组合文库中鉴定其结合肽的靶

靶	参考文献
链霉抗生物素	1, 2, 3
HLA-DR	4, 5
伴刀豆凝集素A	6, 7
钙调蛋白	8, 9
S100	10
p53	11
SH3结构域	12-18
尿激酶受体	19
bFGF-R	
整联蛋白 IIb/IIIa/avB1	20-23
Hsc70	24
组织因子VIIa	
心房肽A受体	
纤连蛋白	25
E-选择蛋白	26
CD1-B2M复合物	27
组织型纤溶酶原激活物	28
乙型肝炎病毒核心抗原	29
HIV-1核壳蛋白NCp7	30
促红细胞生成素受体	31
胰蛋白酶	32
胰凝乳蛋白酶	33
白细胞介素1受体	34

参考文献: 1. Devlin等人, 1990, 科学 249: 404; 2. Lam等人, 1991, 自然 354: 82; 3. Fowlkes等人, 1993, 基因 128: 59; 4. Hammer等人, 1992, 实验医学杂志 176: 1007; 5. Hammer等人, 1993, 细胞 74: 197;

6. Scott等人, 1992, 美国国家科学院学报 89: 5398; 7. Oldenburg等人, 1992, 美国国家科学院学报 89: 5393; 8. Dedman等人, 1993, 生物化学杂志 268: 23025; 9. Adey等人, 1996, 基因 169: 133; 10. Ivanenkov等人, 1995, 生物化学杂志 270: 14651; 11. Daniels等人, 1994, 分子生物学杂志 243: 639; 12. Sparks等人, 1996, 美国国家科学院学报 93: 1540; 13. Sparks等人, 1994, 生物化学杂志 269: 23853; 14. Cheadle等人, 1994, 生物化学杂志 269: 24034; 15. Rickles等人, 1994, EMBO J. 13: 5598; 16. Rickles等人, 1995, 美国国家科学院学报 92: 10909; 17. Chen等人, 1993, 美国化学学会杂志 115: 12591; 18. Yu等人, 1994, 细胞 76: 933; 19. Goodson等人, 1994, 美国国家科学院学报 91: 7129; 20. O'Neill等人, 1992, 蛋白质(Proteins) 14: 509; 21. Fong等人, 1994, 药物发展研究 33: 64; 22. Kolvunen等人, 1993, 生物化学杂志 268: 20205; 23. Kolvunen等人, 1993, 细胞生物学杂志 124: 373; 24. Takenaka等人, 1995, 生物化学杂志 19839; 25. 细胞生物学杂志 130: 1189; 26. Martens等人, 1995, 生物化学杂志 270: 21129; 27. 科学 269: 223; 28. 美国国家科学院学报 92: 7627; 29. Dyson等人, 1995, 美国国家科学院学报 92: 2194; 30. FEBS Lett. 361: 85; 31. Wrighton等人, 1996, 科学 273: 458; 32. Fang等人, 1996, 生物化学与生物物理学研究通讯 220: 53; 33. 层析杂志 711: 119; 34. Yanofsky等人, 1996, 美国国家科学院学报 93: 7381.

在本发明的方法的实施中, 当对电极施加电流时, 电子通过反应组分之间的一系列氧化还原反应从电化学标记物转移至介质, 然后转移至电极。然而, 仅当电化学标记物在电极表面高度浓缩时, 氧化还原电子转移才是最大的(仅仅产生可检测的电流)。当电化学标记的生物结合对第二种成分与作为靶蛋白固定于电极上的生物结合对第一种成分相结合时, 才发生电子转移。图1说明了此图解。

在本发明的方法的一种应用中, 提供为了得到蛋白质-蛋白质相互作用的拮抗剂对天然产物和组合化学文库的高通量筛选。这些蛋白质-蛋白

质特异相互作用的低分子量化学拮抗剂对于制药工业是有价值的，可作为潜在的药物先导用于开发治疗剂。在本发明这些方法的实施中，将含生物结合对第一种成分的靶蛋白固定于电极表面。这第一种电极置于本发明的装置的反应室中，优选地置于微量滴定板孔中，该反应室包含一种电化学标记的替代配体和一种化合物或化合物的混合物，检测此化合物抑制替代配体与靶蛋白结合的能力。（应当理解，保留特异性结合特性的生物活性蛋白质的片段也包含于本发明电极的靶蛋白的范围之内。）例如，在代表性实验中，每种反应室或微量滴定样品孔可包含分离的组合化合物或纯化的天然产物（如聚酮化合物或发酵培养液成分）。在电极存在下温育此化合物后，进行反应室中产生的电流的电势分析；优选地，该分析是循环伏安法。对含电化学标记的替代配体、存在及不存在待测化合物或化合物的混合物的孔的分析结果进行比较。同不与靶结合、显示对替代配体的结合没有影响的化合物相比，抑制电化学标记的替代配体与固定于电极表面的靶蛋白结合的化合物产生的电流减少。在本发明的实施中，每一测定中包括用于检测因靶蛋白变性引起的观测电流减少的适当对照。这些对照包括测试反应室中的实验电极，该实验电极是用含电化学介质和电化学标记的替代配体、不含待测化合物的溶液新鲜制备的，并且使用非相关靶蛋白包被的电极测试这些化合物。最佳地，本发明的方法在96孔微量滴定板上实施，于是可配置96种电极以同时使用。在其它实施方案中，包含固定于其上的不同靶蛋白的多种电极与每个孔电接触，并用来估计单个化合物对含生物结合对第一种成分的不同靶阵列与含生物结合对第二种成分的多种不同电化学标记的替代配体结合的抑制能力。

另外，进行竞争性结合测定，以检测通过引起靶蛋白构象改变而影响靶蛋白与电化学标记的替代配体之间特异性结合的化合物。在本发明的方法的这些实施方案中，首先用电化学标记的替代配体温育电极，洗涤，然后置于含待测化合物的反应室中。与靶上可及部位结合并诱导靶的构象或变构改变的化合物，引起电化学标记的替代配体的释放，通过在反应室中观测到造成电流降低来检测此化合物，检测方法包括例如循环伏安分析法。如上，进行适当的对照反应以检测因靶蛋白变性引起的替代配体结合



的损失。

本发明也提供方法，用于测定生物结合对成分之间的相互作用如蛋白质-肽和蛋白质-蛋白质相互作用的结合亲和力。这些测定法可用于测定生物结合对的组分之间相互作用的解离常数 ( $K_d$ )。这些方法提供了测定结合亲和力和解离常数的现有方法如表面胞质基因组共振仪 (例如, BIAcore®, Pharmacia) 的备择方案。本发明的方法优越于以前公开的技术, 因为本方法更快速、成本低并且只需要少量的生物材料。另外, 使用电探针和分子量为300道尔顿或更高的电化学配体可实施本发明的方法。相反, 现有技术已知的方法需要至少约5千道尔顿大小的配体, 因为使用现有技术方法的信号强度与结合配体的大小成正比。这种限制妨碍对分子量低于截断阈值5kD的分子进行结合相互作用特性的分析。这种限制是重要的, 因为小分子量的化合物构成了大多数的潜在药物先导化合物。另外, 使用本发明的方法和装置的测定条件比使用现有技术的方法所需的测定条件更易达到, 包括但不限于探针浓度、盐浓度和在有机溶剂存在下进行测定等条件。

本发明也提供方法和装置, 用于测定生物结合对的成分之间相互作用的结合亲和力和化学“强度”。已知生物结合对两种成分之间相互作用的强度是重要的, 可用于确定此相互作用是否有作为发现药物的良好目标的潜力。以快速、便宜和方便的测定法检测这些相互作用的能力可大大促进靶的证实和筛选。本发明的方法针对特异性结合或以其它方式特异相互作用的能力, 提供了筛选生物结合对的任何两种成分的能力。本发明也提供这样的方法, 使用结合对的一种或两种成分的截短或改变形式, 用于对结合对的成分之间的相互作用区作图。对于蛋白质-蛋白质相互作用, 目前在药物发现中有几种所关心的, 列于表II中。

在本发明的方法的又一种实施方案中, 提供了检测化学和生物化学分子的复杂混合物中生物结合对的成分之间特异性结合和其它相互作用的方法。在一种实施方案中, 提供了蛋白质: 蛋白质相互作用的方法。使用现有技术难以检测或表征这些相互作用。使用本发明的方法, 用特定靶蛋白包被的电极与电解质溶液和细胞提取物一起温育, 其中电解质溶液包含电

化学标记的替代配体，细胞提取物包含与电极上的靶蛋白特异相互作用的蛋白质。如使用本发明的方法进行竞争性结合实验的其它实施方案所述，代替电化学标记的替代配体之相互作用蛋白质的结合导致在电化学分析（如循环伏安法）中产生的电流减少。

检测蛋白质-蛋白质相互作用的本发明方法优越于目前使用的方法，通过与在蛋白质纯化期间测定柱级分的当前方法相对比说明了这一点。当前使用的技术包括层析柱级分的酶测定，它产生放射性产物，并且仅适用于具有已知酶活性的蛋白质。对于具有未知酶活性的蛋白质，使用ELISA测定、应用放射性标记靶的条带移位分析或共免疫沉淀（需要针对放射性标记靶的抗体）。这些方法的每一种都是费时的和冗长的，并且频繁地需要使用放射化学检测法，从安全和管理考虑是不利的。

相反，本发明的方法快速、特异且便宜。本发明的电化学筛选方法的另一个优点是，这些筛选方法能检测现有技术不能检测的弱蛋白质-蛋白质相互作用。本发明的方法也适用于蛋白质纯化技术的多种备择实施方案，包括层析级分的分析、关于靶结合蛋白质在肿瘤组织样品中存在的组织分布调查，以及如使用同步细胞的提取物用于细胞周期特异相互作用。

表II 关心的相互作用

分子1	分子2
纤连蛋白	整联蛋白
抗原	抗体
钙调蛋白	~ 20效应分子
微管蛋白	微管结合蛋白
肌动蛋白	肌动蛋白结合蛋白、Dnase I
p53	MDM2
cdk	细胞周期蛋白、p21
ras	raf
fos	jun
TBP	RNA聚合酶
Sos	Grb2
p53	p53BP2
K-通道	src
多种蛋白质	含WW结构域的蛋白质
ptyr蛋白质	SH2结构域、PTB结构域、磷酸酶
UGI	UDG
调节亚单位PKA	催化亚单位PKA
增强子元件	增强子结合蛋白
DNA	转录因子
RNA	RNA结合蛋白
伴刀豆凝集素A	凝集素
脂类	脂蛋白
脂肪酸 (FA)	FA结合蛋白
类固醇	类固醇激素受体
巨细胞病毒DNA聚合酶	聚合酶辅助因子
BPTI	胰蛋白酶
Rb	E2F、E1A、SV40 T抗原

参考文献: Iwabuchi等人, 1994, 美国国家科学院学报 91: 6098; Holmes等人, 1996, 科学 274: 2089; Rozakis-Adcock等人, 1993, 自然 363: 83; Phizicky等人, 1995, 微生物学综述 59: 94; Chan等人, 1996, EMBO J. 15: 1045; Chen等人, 1995, 美国国家科学院学报 92: 7819; Sudol等人, 1995, FEBS Lett. 369: 67.

本发明的方法和装置优越于本领域已知的分析技术和装置, 这是由于下列原因。第一, 本发明的方法的敏感度允许检测超过4-5个数量级浓度(即10000-100000倍)的生物结合对成分之间的特异性结合相互作用。本发明提供了这样的检测方法, 其具有放射化学检测方法的敏感度, 而没有伴随基于放射化学方法的健康、安全和管理顾虑。本发明也提供生物结合相互作用的检测, 其具有宽范围的结合亲和力及高敏感度。第二, 该测定快速、便宜并在体外进行。第三, 本发明的实施中所用的试剂(即电极和电化学标记的替代配体)是稳定的, 与例如放射化学试剂相比具有相对长的保存期限。第四, 能定量测定结构-活性的关系, 这基于例如使用循环伏安法观察的药物结合动力学变化的测定。第五, 该分析可以是多元的, 即, 每种反应能在具有含一种以上固定靶蛋白的电极的反应室中进行, 以便能对潜在的药物先导化合物或其混合物分析其与多种潜在靶的结合。第六, 本发明的方法和装置可进行自动化, 包括但不限于多孔(如96孔微量滴定)测定板的使用和反应室的电极和电化学组分的机器人控制。第七, 本发明的电化学测定法的敏感度允许对少量(大约50000个与靶结合的电化学标记物)替代配体、抑制化合物之一或两者的检测, 以此提高进行测定如药物筛选的效率。第八, 效率的提高引起高通量的筛选, 解决了药物开发的主要障碍。第九, 本发明提供测定生物结合对相互作用的解离常数的方法, 它们比已知的方法(包括, 例如, 平衡透析、分析超离心、分析微量量热法和BIAcore®分析)更快速、便宜并且需要较少的样品。第十, 在缺乏关于任何靶蛋白或替代配体的结合配偶体的特征信息时, 能进行本发明提供的测定。该优点免除了在表征蛋白质之前需知道靶蛋白生物学活

性的需要。第十一，本发明的测定是灵活的，允许对任何生物结合对进行结合或竞争性结合分析。此外，结合对的任一个可被电化学标记，在适当的测定条件下，在反应室的电解质溶液中可以有生物结合对的全部两种成分。

本发明的装置也提供亲水的多聚体修饰的电极，它包含生物结合对的第一种成分，优选地蛋白质，最优选地一种受体或其片段，以及固定的电化学介质。该生物结合对的第一种成分（如蛋白质）和电化学介质与多聚体支持物化学连接，此连接是直接通过活性基团间共价键的形成或通过相互的活性化学连接体完成的。例如，几种氨基酸的侧链包含亲核的杂原子，这些杂原子能经历向聚乙二醇二环氧甘油醚中环氧化物功能团的加成。另外，多聚体如聚赖氨酸中存在的亲核物质能通过双功能活化的亲核物质如二环己基碳二亚胺-、N-羟基丁二酰亚胺-或羟基苯并三唑-活化的二羧酸酯与蛋白质连接。偶联电化学介质的方法包括过渡金属复合物与多聚体上亲核原子的配位、活性基团向有机介质或金属复合物配体中的掺入、或沿多聚体主链的过渡金属结合位点的掺入。例如，聚乙烯咪唑与双二吡啶钌(II)的配位产生非常稳定的多聚体，其中Os(II)和Os(III)在适度的外加电势下互变。二吡啶配体的化学修饰产生金属复合物，该复合物包含用于偶联亲核物质的活化羧酸酯部分，和在自动生物多聚体合成中允许复合物直接掺入的其它功能团。

在本发明的装置的这些实施方案中，也包括生物结合对的第二种成分，优选地是在此定义的肽或核酸替代配体，它们与含电化学活化的催化物种的电化学催化剂相偶联。这些电化学催化剂的实例是酶，如葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶，它们实现其底物的氧化或还原，并在不足以实现底物的直接电化学的电势下被电化学活化。本领域中理解这些酶通过降低底物的氧化还原中的电化学阈实现催化，以使电极电势的明智选择实现在电极附近的酶催化反应的选择性电化学检测。同样，几种合成的过渡金属复合物如氧钌(IV)、氧铱(IV)、氧钼(IV)、二氧钼(VI)和二氧铪(VI)复合物在直接电化学不可能的电势下能氧化或还原底物中的多种有机功能团。（例如，见Stultz等人，1995，美国化学学会杂志 117:

2520; Cheng等人, 1995, 美国化学学会杂志 117: 2970; Neyhart等人, 1993, 美国化学学会杂志 115: 4423; Schultz等人, 1993, 美国化学学会杂志 115: 4244; Thorp等人, 1989, 无机化学 28: 889)

在本发明该实施方案的应用中, 生物结合对第二种成分与生物结合对第一种成分的结合浓缩了靠近电极的电催化剂和固定于其上的介质。电催化剂、底物和电化学介质之间的氧化还原反应在电极处产生电流, 这是由于氧化还原等价物向底物的转移。当对电极施加足够的电势时, 固定的介质被完全氧化或完全还原。例如, 使用与辣根过氧化物酶连接的替代配体, 该替代配体在电极表面与生物结合对第一种成分的结合, 使辣根过氧化物酶充分接近电极上还原的电化学介质, 以还原该酶本身。酶的这种还原形式是活性形式, 因此能催化地作用使电子向溶液中的过氧化氢转移, 产生氧和水。每一催化循环后, 该酶被包含电极的多聚体中的电化学介质组成性还原, 当重复完整过程时, 利用通过电极流向溶液的电流, 检测和定量替代配体的结合。因此, 在底物浓度和电极外加电势的适当条件下, 产生的电流与生物结合对的成分在电极表面结合的量 and 程度成正比。

在此提供的本发明方法的一种应用是测定生物结合对的结合动力学的方法。在替代配体-酶偶联物缺乏时(或在与非结合物种连接的酶存在下), 几乎没有电流从多聚体修饰的电极向酶底物转移。在电化学催化剂和对固定的生物结合对第一种成分具有结合特异性的替代配体之间加入偶联物后, 并在足够浓度的电化学催化剂的底物存在下, 电流显著增强, 并最终达到稳定的稳态值。由于选择电极电势以实现酶的瞬时反应性, 并且底物以较大的过量存在于溶液中, 所以作为结合替代配体偶联物在电极表面的数量渐增的反映, 电流增强, 直到所有可能的结合部位都被占据。电流以典型的速率常数增强, 即结合反应的速率常数; 籍此发明为测量所述速率常数提供了有效方法。相反, 解离速率常数的测定是通过将偶联物饱和的电极浸入不含偶联物的溶液中, 并测定产生电流的降低速率。这些结合速率和强度的知识对于理解生物分子之间的相互作用十分重要, 这些作用包括但不限于蛋白质-蛋白质、蛋白质-药物和蛋白质-核酸药物的结合现象。

在本发明的另一种应用中, 偶联物的结合或结合的缺乏被用来确定电

化学无活性物种对可用结合部位的占据。一般地，这些物种是来源于天然产物或组合合成分子的大文库的单一药物候选物。能用至少三种相关技术确定药物候选物的结合。在第一种实施方案中，用药物候选物预温育电极，以使候选药物与电极固定的生物结合对第一种成分之间任何可能的结合相互作用在加入替代配体偶联物之前发生。与缺乏药物候选物时产生的电流相比，加入偶联物后电流的减少是电极固定的生物结合对第一种成分的可用结合部位被药物占据程度的量度。在第二种实施方案中，同时加入药物候选物 and 不同浓度的替代配体偶联物，药物候选物的存在对产生电流的影响被用来确定药物对替代配体结合的抑制常数。在第三种实施方案中，在加入药物之前可用偶联物饱和电极，由此可观测电流的损失表明药物候选物置换替代配体结合的能力。普通技术人员知晓这些方法在表征任何目标生物结合对的药物候选物的结合和抑制特性中的应用。

在下列实施例中更充分地说明了本发明的其它特征。这些实施例说明了上述方法的某些方面及有利的结果。给出这些实施例是为了说明而不是为了限制。

## 实施例1

### 电化学标记的肽的制备

使用本领域公认的技术制备电化学标记的肽（见Yocom等人，1982，美国国家科学院学报 79: 7052-7055; Nocera等人，1984，美国化学学会杂志 106: 5145-5150）。在一种实施例中，如下标记衍生的肽NPDF-1，它具有氨基酸序列：

Gly-His-Gly-Ser-Gly-Arg-Ala-Leu-Pro-Pro-Leu-Pro-Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>  
(SEQ ID No.: 1)。

使用常规技术（见Ford等人，1968，美国化学学会杂志 90: 1187-1194; Vogt等人，1965，无机化学 4: 1157-1163）通过{Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>Cl}Cl<sub>2</sub>在铈/汞合金上的还原产生电化学标记物Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>(H<sub>2</sub>O)<sup>2+</sup>。浓度大约0.2mM的肽（约5mg）与50倍摩尔过量（~10mM）的Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>(H<sub>2</sub>O)<sup>2+</sup>在氩氛围下在50mM磷酸钠缓冲液（pH7.0）中室温反应48小时（图6）。将溶液加于

用50mM缓冲液平衡的Sephadex G-25柱 (Pharmacia, Upsala, 瑞典) 上终止反应。从该柱中集中含肽的级分, 氧化并浓缩。然后通过阳离子交换层析分离此氧化的混合物的组分, 使用以50mM磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 4℃平衡的Whatman CM-纤维素 (CM52) 层析柱。收集含电化学标记的肽的级分, 并于4℃保存直到使用。

### 实施例2蛋白质固定的电极的制备

购买  $2\text{cm}^2$  正方形玻璃片状的加锡的氧化铟电极 (Delta Technologies), 并如下准备使用。清洁电极, 方法是通过在Alkonox、纯异丙醇、去离子的蒸馏水 (三次)、最后在希望的缓冲液中连续处理, 在实验室超声波仪中超声处理; 每次超声处理进行10分钟。然后将清洁的电极浸于5mM 1,12-十二二羧酸溶液中, 室温温育48-72小时, 随后用己烷 (分析纯级) 冲洗电极。

然后如下进行蛋白质与制备的电极交联。将5mM 1-(3-二甲氧丙基)-3-乙基碳二亚胺溶液的50 $\mu\text{l}$ 等份置于电极的一侧, 室温干燥。将20ml溶于磷酸缓冲盐溶液 (PBS) /0.1%吐温20的4mg/ml融合蛋白溶液置于之前用碳二亚胺处理的干燥电极的表面, 4℃温育过夜, 以进行交联。温育后, 用100mM Tris-HCl (pH8.0) /100mM NaCl溶液洗电极一次5分钟, 并4℃保存于PBS中直到使用。

### 实施例3 循环伏安法

使用 EG&GPAR 273A 稳压器 / 稳流器收集循环伏安值 (voltammogram), 该设备中具有单室电压电流单元, 装备有修饰的加锡氧化铟 (ITO) 工作电极 (面积= $0.32\text{cm}^2$ )、铂 (Pt) 丝对电极和银/氯化银 (Ag/AgCl) 参比电极 (见Johnston等人, 1994, 无机化学 33: 6388-6390)。图7显示了这种伏安值的一个实例, 它是在以下条件下产生的。以15mV/s的速度扫描含50mM  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ 和20mM  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5^{3+}$ -标记的肽的样品, 此肽溶于含50mM磷酸钠缓冲液 (pH6.8) /700mM NaCl (具有780mM的总钠离子浓度) 的缓冲水溶液中。用电化学标记的肽扫描后,



用相同的50mM磷酸钠缓冲液冲洗电极，然后用50mM  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ 或含50mM  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ 的未标记的肽溶液冲洗电极。洗涤后用50mM  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ 获取循环伏安值。在不存在电化学介质时  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ -标记的肽的扫描显示电流未明显降至-0.2V（对于Ag/AgCl）。使用新鲜制备的电极进行每个实验，对每种电极收集单独缓冲液的背景扫描，并从随后的扫描中将其减去。

#### 实施例4 检测特异性结合的电化学测定

使用本发明的电化学分析装置和方法如下检测和分析Src SH3结构域与特异性结合的SH3肽之间的特异性结合相互作用。用谷胱甘肽硫转移酶（GST）-Src SH3融合蛋白（使用自Pharmacia获得的GST基因融合系统制备）或GST本身包被如实施例2所述制备的电极。如以上实施例1所述及图6所示，用钌标记NPDF-1肽（GHGSGRALPPLPRY；SEQ ID No.: 1）。该电极用标记的肽溶液和钌介质（六胺钌（III））温育2小时。用缓冲液洗电极并如实施例3所述进行循环伏安法。也在钌电化学介质存在下及不存在钌标记的肽时进行测定。根据循环伏安曲线的积分（如图3所示）及背景信号的减除（如图4所示）进行数据分析，该背景信号是在单独的电化学介质存在下通过温育和循环伏安法产生的。使用积分程序积分伏安值曲线下的面积，并从在电化学标记探针存在下对用单独GST或用GST-Src-SH3融合蛋白包被的电极获得的数据中减去在单独介质存在下获得的积分电流数据。结果显示肽与GST-Src SH3包被的电极的相互作用产生更高的信号（信号分析显示于图5中）。结果证明本发明的电化学分析测定能检测特异的蛋白质-肽相互作用。

用本发明的电化学分析测定显示电化学标记的SH3-结合肽的相互作用是时间依赖的。为证明此时间依赖性，将GST-Src SH3融合蛋白或GST包被的电极与过量的电化学标记的SH3结合肽温育，该肽如实施例1所述制备。以30分钟的间隔经至少4小时获得使用循环伏安法的电化学测定值。使用GST-Src SH3融合蛋白固定的电极经实验的一段时程检测电压电流信号的增强（包括在有无电化学标记的肽时积分电流间的差异），直到在电

化学标记的特异性结合肽的饱和浓度时达到平台期。

使用GST-Src SH3-SH3结合肽结合对证明了电化学信号对本发明的电化学标记肽的浓度的依赖性。实验中，如实施例2所述将不同量的GST-Src SH3融合蛋白固定于电极上。对于每种GST-Src SH3固定的电极，使用一系列电化学标记的SH3结合肽的浓度进行循环伏安法，在特定的温育时间后分析电化学信号的产生。每种浓度的固定GST-Src SH3的信号随肽浓度的逐渐提高而增强，对于相同的肽浓度，电压电流信号随固定于电极上的靶融合蛋白量的逐渐增加而增强。这些结果证明，电化学信号的数量级与固定于电极上的蛋白质浓度成正比，也与溶液中电化学标记的肽的浓度成正比。

通过对链霉抗生物素与结合生物素结合位点的肽之间的相互作用进行电化学分析也证明了特异的蛋白质-肽相互作用。用实施例2所述的方法以上述GST-Src SH3融合蛋白或链霉抗生物素包被制备电极。然后温育包被的电极，条件是存在适当的电化学介质和上述Src SH3结合肽的电化学标记的物种，或具有一种肽的电化学标记的物种，该肽具有氨基酸序列：

His-Gly-Ser-Gly-Ser-Phe-Ser-His-Pro-Gln-Asn-Thr (SEQ ID No.: 2),

可与链霉抗生物素上的生物素结合位点相结合。温育后，如实施例3所述洗涤电极并进行循环伏安法。积分循环伏安法数据，如上所述减去在电化学介质存在下和不存在电化学标记的特异肽时用这些电极获得的背景积分电流。对含固定的GST-Src SH3的电极检测特异信号，在电化学标记的SH3结合肽存在下进行分析，并在电化学标记的链霉抗生物素结合肽存在下对含固定的链霉抗生物素的电极进行检测分析。然而，对含固定的GST-Src SH3的电极未检测到特异信号，在电化学标记的链霉抗生物素结合肽存在下未分析到特异信号，或者在电化学标记的SH3结合肽存在下对含固定的链霉抗生物素的电极未检测到特异信号。

进行本发明的电化学分析测定法应用的另一种示范，以检测含固定靶蛋白MDM2的电极与电化学标记的肽之间的特异相互作用，该肽对应于肿瘤抑制基因p53的一个片段。使用如以上实施例2所述用靶蛋白MDM2

包被的电极捕获替代配体，该配体具有来源于p53天然氨基酸序列的氨基酸序列：

生物素-His-His-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gln-Thr-Phe-Ser-Asp-Leu-Trp-Lys-Leu (SEQ ID No.: 3)，

已知它可与MDM2特异性结合（见Picksley等人，1994，癌基因 9: 2523）。用GST-Src SH3融合蛋白或链霉抗生物素包被的电极用作非特异信号的对照。在电化学标记的p53肽存在下温育固定了MDM2的电极。然后如上所述洗涤电极，并在电化学介质存在下进行循环伏安法。积分循环伏安法数据，如上所述减去在介质存在下和电化学标记的特异肽缺乏时用这些电极获得的背景积分电流。使用固定MDM2的电极在电化学标记的p53肽和介质存在下，在循环伏安法实验中检测特异信号，其指示p53肽与MDM2之间的特异相互作用。用电化学标记的p53肽和含固定的GST-Src SH3或链霉抗生物素的电极在循环伏安法实验中未检测到特异相互作用。

这些结果显示，本发明的固定的电极能用来检测含蛋白质的生物结合对与电化学标记的特异性结合肽之间的特异相互作用。

#### 实施例5 用于筛选组合文库的电化学测定

使用本发明的电化学测定来筛选组合化学文库，以检测干扰电化学信号的样品，此信号是通过循环伏安法从GST-Src-SH3融合蛋白与电化学标记的SH3结合肽之间的相互作用而获得的。由于电化学测定可用来为了获得破坏靶：肽相互作用的化合物而筛选化学化合物文库，筛选条件不应能易被干扰，或者由此减少循环伏安法的输出。最佳地，这种筛选应在宽范围的pH或盐浓度中起作用，并且对于组合化学文库中经常遇到的普通污染物（如偶联剂）不敏感。

为了评价用于筛选组合文库的电化学分析测定法在不同条件下的稳定性，如上所述将本发明的GST-Src SH3固定的电极与电化学标记的SH3结合肽一起温育。在所选的化学药品如酸、碱、盐和含功能团如醛、酮和醇的化学药品存在下，进行循环伏安法实验。实验中，发现大多数这些化学

药品的存在对电化学信号没有影响。

#### 实施例6 测定已知蛋白质：肽相互作用的 $K_d$ 的电化学分析

用本发明的电化学分析法测定Src-SH3结构域与许多短的、富含脯氨酸的特异性结合肽之间相互作用的 $K_d$ 。已广泛研究了Src SH3结构域与短的、富含脯氨酸的肽如Arg-Pro-Leu-Pro-Pro-Leu-Pro (SEQ ID NO.: 4) 和Ala-Pro-Pro-Val-Pro-Pro-Arg (SEQ ID NO.: 5) 的相互作用，并通过确证的方法如BIAcore® (Pharmacia) 测定了 $K_d$ 值。平均而言，这些肽显示以 $5\mu\text{M}$ 的 $K_d$ 与Src SH3结构域结合。这些数据为比较电化学测定法对相同相互作用提供精确 $K_d$ 值的能力提供了坚实的基础。

用本发明的电化学分析法测定GST-Src SH3与SH3结合肽相互作用的 $K_d$ 值，该方法提供了与药理学确证的方法的比较。用GST-Src SH3融合蛋白包被的电极与上述富含脯氨酸的SH3结构域特异性结合肽的电化学标记物种一起温育。如上所述用循环伏安法产生电化学信号，并如以上实施例5所述经一定时间监测该信号。在肽的不同浓度时收集电化学信号的数据，并用此电化学信号计算该肽的 $K_d$ 值。也用BIAcore®法作为内部对照测定 $K_d$ 值，并用两种分析法之间结果的比较来验证使用本发明的电化学分析法测定的值。

#### 实施例7 检测复杂混合物中蛋白质：肽相互作用的电化学分析

使用本发明的电化学分析方法和装置检测复杂混合物中的蛋白质：肽相互作用。在这些实验中应用了多种不同的靶分子和特异性结合肽的来源。

尽管使用噬菌体显示文库或通过筛选组合文库（见共同拥有的和共同未决的美国专利申请，系列号08/740,671，1996年10月31日递交，在此引入作为参考）来发现蛋白质的替代配体通常是可能的，但蛋白质的天然配体更难以鉴定。本发明的电化学筛选测定提供了一种相对简单的鉴定天然配体的方法。为证明本发明的电化学分析法的此方面，检测细胞提取物中Src SH3结构域的天然配体。GST-Src SH3结构域融合蛋白包被的电极与

电化学标记的Src-SH3结合肽一起温育，以给SH3结构域特异地“装上”电化学标记的肽。然后将该电极与来源于约 $10^7$ - $10^8$ 个HeLa细胞的全细胞提取物温育，并进行循环伏安法。进行数据分析以确定由于电化学标记的肽被HeLa细胞提取物中存在的化合物所取代引起的电化学信号降低的程度。然后用常规生物化学分级分离技术包括多种层析方法（如使用DEAE Sepharose的阴离子交换层析、使用羧甲基Sepharose的阳离子交换层析和使用Sephadex和Sepharose的体积排阻层析）分级分离细胞提取物。每次分级分离后，如循环伏安法所检测的，对级分分析化合物的存在，该化合物能代替电化学标记的特异性结合肽的结合。只有具有这种活性的级分才进行生物化学分级分离的随后步骤。几种这样的生物化学纯化步骤之后，经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析活性级分，测定级分的相对纯度。然后使用含均一蛋白质的“条带”的微量测序来分离和鉴定活性蛋白质，该蛋白质包含具有特异肽替代活性的级分。因此本发明的方法提供了一种从生物化合物的均一混合物中检测蛋白质-蛋白质相互作用的敏感测定法。

本发明的电化学分析测定也用来测定用重组遗传方法分离鉴定的孤独(orphan)受体的功能。经常地，发现类似受体编码结构域的编码区域的DNA序列。当发现这些序列时，目前非常难以确定所编码的或这些受体的天然配体受体的生物学功能或活性。对于未知的受体序列，表达受体的胞外结构域，并用作筛选噬菌体显示肽库的靶，以鉴定替代配体。然后以许多方式使用替代配体。进行组合文库的电化学筛选以鉴定该测定法的拮抗剂。然后将这些化合物用于模型生物系统中译解受体的生物学作用。替代配体也用于电化学筛选测定中来鉴定天然配体。分级分离细胞裂解物或上清液，并用本发明的电化学筛选测定法测定，鉴定包含某种分子的级分，该分子从结合电极的靶中置换标记的替代配体。然后可通过测序鉴定由此分离的蛋白质或肽配体。通过质谱分析和其它分析系统可鉴定小分子配体。

本发明的电化学分析测定的应用的一个实例是fas受体配体的鉴定（见Hahne等人，1996，科学 274: 1363；Nagata等人，1995，科学 267: 1449；Takahashi等人，1994，细胞 76: 969；Wanatabe-Fukunaga等人，1992，自然 356: 314）。在几乎所有细胞型中表达的fas受体当被其配体结合时

引发编程性细胞死亡途径。fas受体的配体的表达十分受限制。当一个细胞上的配体与另一个细胞上的受体相互作用时引发编程性细胞死亡。这是治疗上有用的靶，因为最近证明fas配体在某些黑素瘤细胞表面的表达在身体免疫细胞中引发编程性细胞死亡，由此使癌细胞逃避宿主免疫应答。

表达fas的胞外结构域用作噬菌体显示中的靶，以鉴定替代配体（例如，使用共同拥有的和共同未决的美国专利申请系列号08/740,671中公开的方法，于1996年10月31日递交，在此引入作为参考）。然后电化学标记如此鉴定的替代配体，并加于用fas胞外结构域包被的电极上。分级分离浆细胞上清液，通过在此所述的循环伏安法和电化学筛选测定级分，检测那些具有能从电极上置换标记的替代配体活性的级分。通过常规层析技术的一系列分级分离后，检测fas受体配体。

另外，使用本发明的电化学分析法鉴定fas受体的功能。测定中，用fas受体的胞外结构域如上所述经噬菌体显示获得替代配体。标记的替代配体然后用于电化学筛选，以从组合化学文库中鉴定化合物，该化合物可从fas包被的电极上置换和竞争标记的配体。鉴定的化合物可以是fas活性的激动剂或拮抗剂。在模型生物系统中测试此筛选中鉴定的化合物，以如下研究受体功能。例如，将化合物加入表达fas的培养的细胞中，观察细胞的生物学反应。在fas配体的存在下受体拮抗剂阻断编程性细胞死亡途径，而受体激动剂模拟fas配体并引起编程性细胞死亡途径的刺激。因此，编程性细胞死亡的检测提供了一种敏感的测定法，该法能与本发明的电化学分析测定法结合使用以分析fas受体的功能。

#### 实施例8 使用计时安培分析法和水凝胶的电化学分析

使用水凝胶包被的电极进行生物结合对的成分之间特异性结合的电化学分析，该电极包含生物结合对的第一种成分和固定于其上的电化学介质。

##### A. 水凝胶和电极的制备

用Vreeke等人（1995，分析化学 67: 303-306）的方法制备水凝胶。玻璃碳伏安电极（直径3mm）购自Bioanalytical Systems（West Lafayette,

IN), 并用氧化铝磨光, 随后在Branson 1210超声波仪 (Fischer Scientific, Raleigh, NC) 中超声处理备用。然后用甲醇冲洗电极, 空气干燥。聚(乙二醇400二环氧甘油醚)(PEGDGE)购自Polysciences (Warrington, PA)。用钒二吡啶氧化还原中心 (PVI-Os) 修饰的氧化还原多聚体聚(1-乙烯咪唑)如Ohara等人(1993, 分析化学 65: 3512-3517)所述合成。具体地, 水凝胶的制备方法是将5 $\mu$ l的下列每种溶液混合在一起: 生物结合对的第一种成分的溶液, 它一般包含浓度为4-6mg/ml蛋白质的受体蛋白或片段; 10mg/ml PVI-Os和2.5mg/ml PEGDGE。然后将1 $\mu$ l等份的混合物分散至玻璃碳电极的表面。在使用前水凝胶包被的电极于室温固化过夜。

#### B. 使用水凝胶对与src SH3结合的替代配体的电化学检测

如以上部分A所述在水凝胶中固定src SH3结构域。该电极然后用于使用如下制备的替代配体对替代配体结合进行电化学检测。

如下制备链霉抗生物素 (SA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、生物素化的辣根过氧化物酶 (B-HRP) (Sigma) 和生物素化的src SH3替代配体 (His-Gly-Ser-Gly-Ser-Phe-Ser-His-Pro-Gln-Asn-Thr; SEQ ID No.: 2) 的复合物。生物素化的src SH3替代配体 (3 $\mu$ l 120 $\mu$ M (4mg/ml) 溶液, 400pmol) 与B-HRP (4 $\mu$ l 25 $\mu$ M溶液 (1mg/ml), 100pmol) 混合, 将混合物转移至含16 $\mu$ g SA (17 $\mu$ l 16 $\mu$ M (1mg/ml) 溶液) 的试管中。该混合物在室温静置温育20分钟。然后加入生物素 (25 $\mu$ l 100 $\mu$ M溶液, 250pmol), 用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 使溶液体积增加至100 $\mu$ l。

使用BAS100B电化学分析仪 (BAS, West Lafayette, IN) 进行电化学分析 (计时安培分析法)。将上述src SH3-水凝胶包被的电极、Ag/AgCl参比电极 (BAS) 和铂辅助电极浸于5ml含1%牛血清白蛋白的PBS溶液中。在电化学分析的整个过程中搅拌该溶液。src SH3-水凝胶包被的 (工作) 电极与参比电极之间的电势被设定为100mV。在 $t=300$ 秒时, 通过加入5 $\mu$ l 0.1M过氧化氢溶液使溶液具有100 $\mu$ M  $H_2O_2$ 的终浓度。在 $t=600$ 秒时, 加入31 $\mu$ l链霉抗生物素/生物素化的辣根过氧化物酶 (SA/B-HRP) 偶联的替代配体, 至终浓度1 $\mu$ g/ml SA。

本实验的结果显示于图8中, 这是通过向电化学分析溶液中连续加入

这些组分所产生的电流 (nA) 的图。如图8所示, 加入src SH3替代配体后经一定时间检测到电流的增强。一加入SA/B-HRP偶联的替代配体, 立即产生电流, 约1500-2000秒时达到平台期。作为阴性对照, 在计时安培分析实验中使用如上制备的非相关替代配体。使用该替代配体未检测到电流。

这些结果证明, 含生物结合对第一种成分和固定于其上的电化学介质的水凝胶电极能与生物结合对第二种成分和依赖氧化还原的酶催化剂的偶联物在其底物的存在下一起应用, 以使用计时安培分析法检测生物结合对的成分之间的结合。

### C. 与tyrRS结合的替代配体的电化学检测

如部分A所述, 在水凝胶中固定酪氨酸氨酰tRNA合成酶 (tyrRS)。含tyrRS替代配体的复合物如部分B对src SH3替代配体所述制备。如部分B所述进行计时安培分析法, 实验结果显示于图9中。tyrRS替代配体具有氨基酸序列:

Leu-Tyr-Ser-Trp-Pro-Asp-Glu-Gln-Tyr-Glu-Arg-Pro-Ser-Gly-Ser-Gly-Lys (SEQ ID No.: 6)。

如src SH3-SA/B-HRP偶联的替代配体的实验所见, 仅在将偶联的替代配体加入电解质溶液中时, 才在实验中用tyrRS-SA/B-HRP偶联的替代配体结合对检测到电流。在这些实验条件下, 使用非相关替代配体的SA/B-HRP偶联物的阴性对照实验, 不产生可检测到的电流的增强。

这些结果证实了部分B所述的结果, 并说明了该实验方法用于对生物结合对之间的结合进行电化学检测的普遍性。

### 实施例9 生物结合对的抑制剂的电化学检测

用实施例8所述的电化学分析装置和方法进行化合物的电化学分析, 分析其抑制生物结合对的成分之间特异性结合的能力。

有三种本发明的方法的备择实施方案, 用于检测如实施例8所述生物对结合的抑制剂。在第一种实施方案中, 在偶联的替代配体与水凝胶中的靶结合后, 将抑制剂加入电解质溶液中; 实现方法包括向电解质溶液中加入偶联的替代配体, 检测电流产生直到达到平台期电流, 加入推定的抑制



剂以及检测产生的电流量的减少。在第二种实施方案中，向电解质溶液中同时加入抑制剂和偶联的替代配体，并将在推定的抑制剂存在下产生的电流与不存在该抑制剂时产生的电流相比较。在第三种实施方案中，在加入偶联的替代配体之前向电解质溶液中加入抑制剂。

使用第一种方法的分析结果显示于图10中。含tyrRS和SA/B-HRP偶联的tyrRS替代配体的水凝胶电极如实施例8所述制备。除 $t=1300$ 秒时，通过加入 $100\mu\text{l}$   $1\text{mM}$ 的tyrRS的特异抑制剂NL932的溶液，使电解质溶液达到 $10\mu\text{M}$ 该抑制剂的终浓度之外，如实施例8所述进行计时安培分析法。如图10所示，抑制剂的加入引起电流的急剧下降（产生电流约25%下降）。这些结果表明，使用本发明的水凝胶电极能检测生物结合对结合的抑制剂，甚至在生物结合对结合之后也能实现。

使用第二种方法的分析结果显示于图11中。含tyrRS和tyrRS替代配体的SA/B-HRP偶联物的水凝胶如实施例8所述制备。除与替代配体（于约 $t=0$ ）一起向电解质溶液中加入 $10\mu\text{M}$  NL932（终浓度，如上所述加入）之外，如实施例8所述进行计时安培分析法。如图11所示，抑制剂和偶联的替代配体的同时加入导致峰电流下降58%。使用该方法观察到的下降大于使用上述第一种方法观察到的下降。

使用第三种方法的分析结果显示于图12中。含tyrRS和tyrRS替代配体的SA/B-HRP偶联物的水凝胶如实施例8所述制备。除在计时安培分析法开始之前，将水凝胶电极在 $5\text{ml}$ 含 $10\mu\text{M}$  NL932的溶液中搅拌温育15分钟之外，如实施例8所述进行计时安培分析法。通过加入偶联的tyrRS替代配体和底物开始计时安培分析实验；在偶联的替代配体加入之前将电极在抑制剂溶液中保存另外的10分钟。如图12所示，与无抑制剂时进行的计时安培分析法相比，用抑制剂与水凝胶的预温育引起峰电流降低80%。

尽管发现所述所有三种方法都允许对tyrRS抑制剂的检测，但测定的最敏感的方法是用水凝胶与抑制剂预温育（所述第三种方法）。同时加入抑制剂和替代配体在敏感度方面居中（所述第二种方法），在替代配体后加入抑制剂是最不敏感的（所述第一种方法）。结果证明了本发明的方法和装置可对抑制生物结合对结合的化合物提供敏感的检测，并因此提供了

一种敏感的筛选方法，用于筛选针对破坏与疾病相关的不适当或病理性生物结合对结合的药物。

#### 实施例10 使用替代配体对结合率常数的电化学测定

使用实施例8部分C中公开的tyrRS与其替代配体之间结合测定的计时安培分析法，测定替代配体与固定于本发明电极上的tyrRS的结合率常数。含tyrRS的水凝胶如实施例8部分A所述制备。制备含tyrRS替代配体的复合物，如实施例8部分C所述进行计时安培分析法。如图9所示，一加入替代配体复合物，即观察到电流的显著增强。根据单指数速率动力学该电流达到饱和限制的值。根据以下方程式能计算替代配体复合物的结合或置换的一级速率常数：

$$(I_{\text{sat}} - I) = (I_{\text{sat}} - I_0) \exp(-kt)$$

其中I是时间t时的电流，k是一级速率常数，下标“0”和“sat”分别表示复合物加入时和结合饱和后观察到的值。一级速率常数可用以下关系式确定：

$$k = -\{\ln(I - I_0) - \ln(I_{\text{sat}} - I_0)\} / t$$

该方程式用来确定tyrRS-替代配体结合反应的结合速率常数为 $0.0012\text{s}^{-1}$ 。

同样，如图10所示和实施例9所述，tyrRS-替代配体结合的抑制剂的加入导致电流减弱。这种电流的减弱也达到饱和限制的值，使用以上的方程式可用该值确定抑制剂置换替代配体的速率常数。对于竞争性抑制剂NL932，替代配体置换的结合速率常数被确定为 $0.0035\text{s}^{-1}$ 。

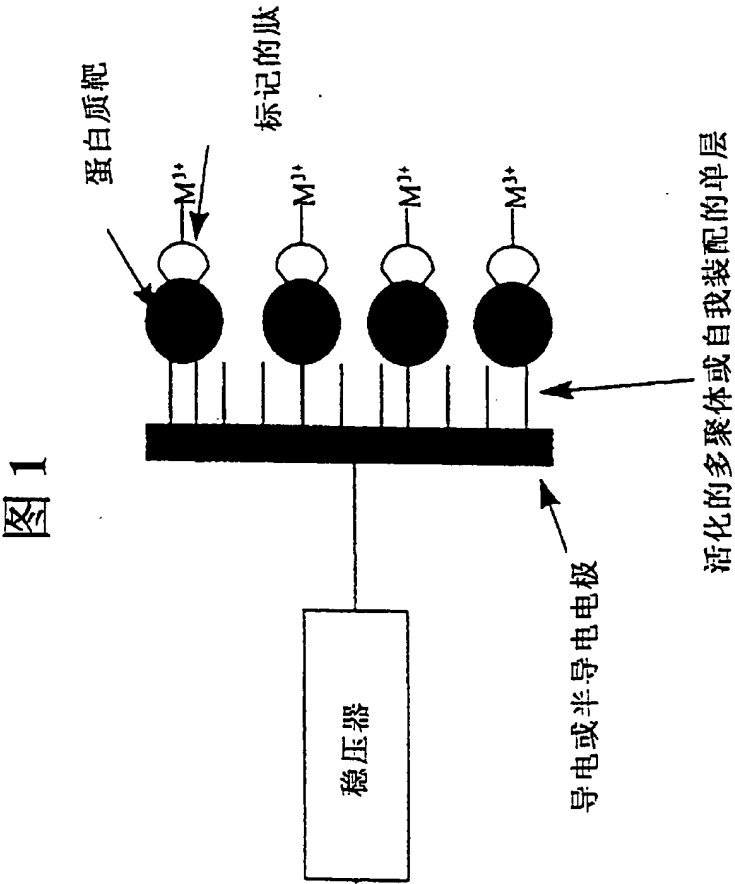
#### 实施例11 替代配体复合物的竞争性抑制剂的抑制常数的测定

使用实施例8部分C中公开的tyrRS与其替代配体之间结合测定的计时安培分析法，测定替代配体的竞争性抑制剂的抑制常数，该替代配体可与固定于根据本发明的电极上的tyrRS相结合。含tyrRS的水凝胶如实施例8部分A所述制备。制备含tyrRS替代配体的复合物，如实施例8部分C所述进行计时安培分析法。如图13所示，向电极固定的tyrRS-替代配体复合物

中加入递增浓度的竞争性抑制剂NL932，抑制了替代配体与tyrRS的特异性结合。图14显示抑制分数对抑制剂浓度的图，表明竞争性抑制的开始发生在大约50mM的抑制剂浓度时。其它竞争性抑制剂的相似分析能用来对tyrRS-替代配体复合物结合的每种竞争性抑制剂确定特异抑制常数。

应当理解，前述的公开内容强调本发明的某些特定实施方案，如附加的权利要求书所述，与其相当的所有修改或变化都落入本发明的精神和范围之内。

说明书附图



## 方 案

- 制备带有 Src -GST 和 GST 的蛋白质电极
- 与 SH3 结合肽温育
- 洗涤
- 加入介质和测量电流

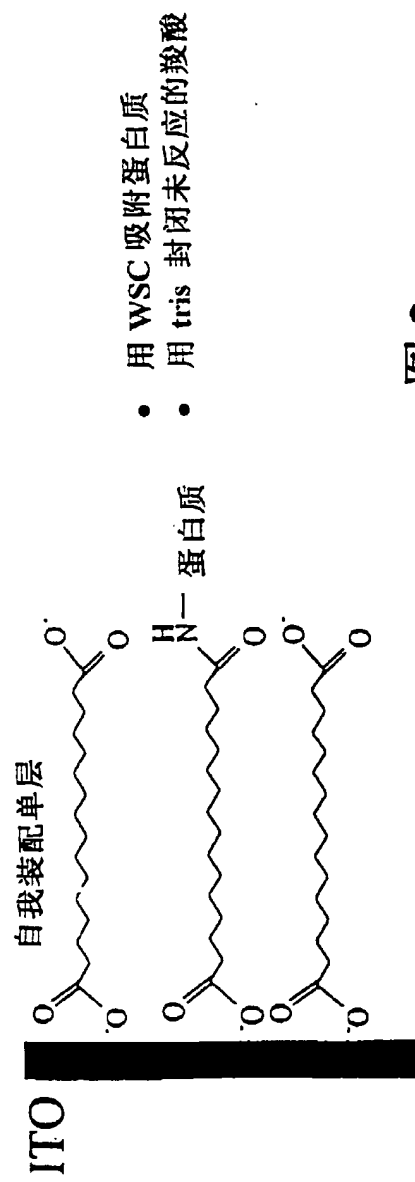


图 2

图 3A

GST 对照

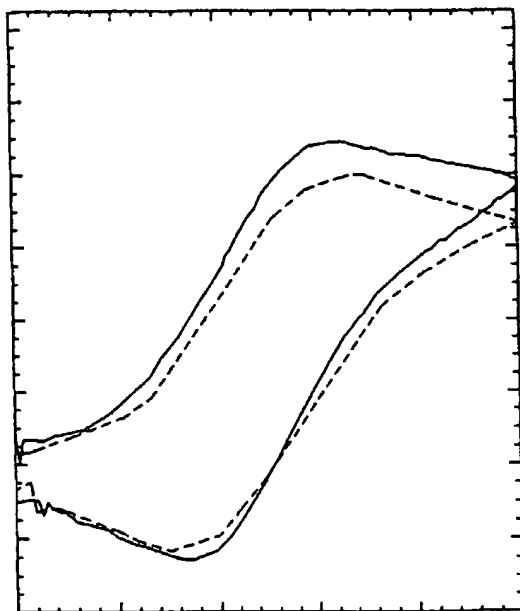


图 3B

SRC SH3

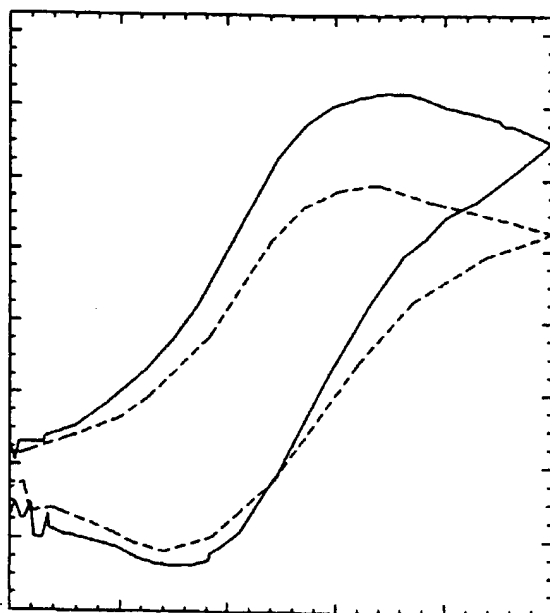


图 4A

减法

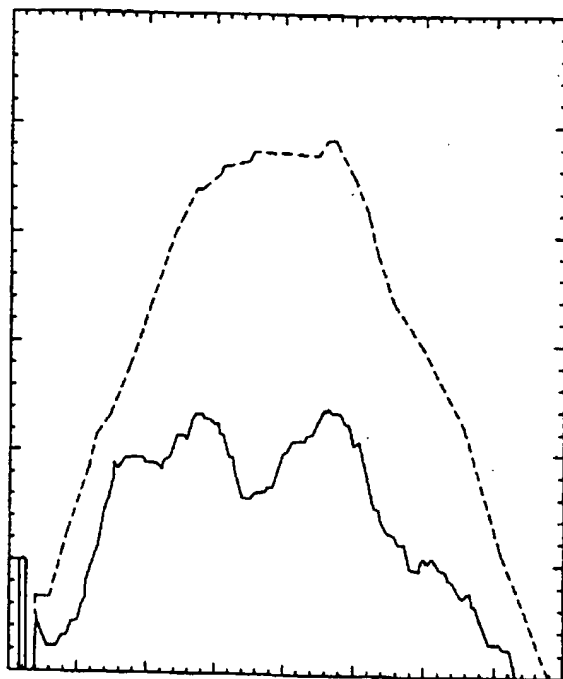




图 4B

积分

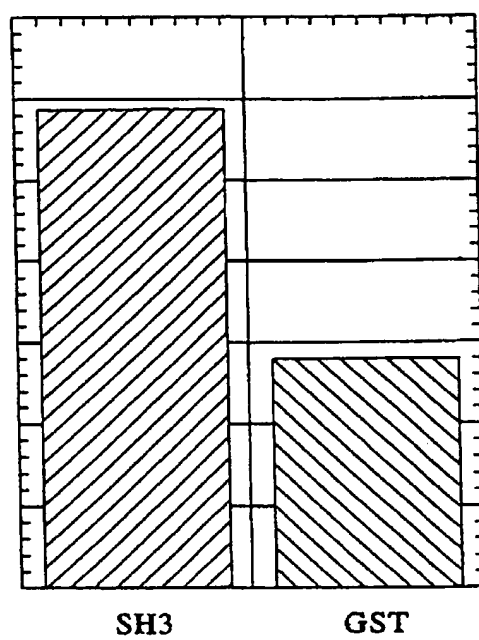


图 5

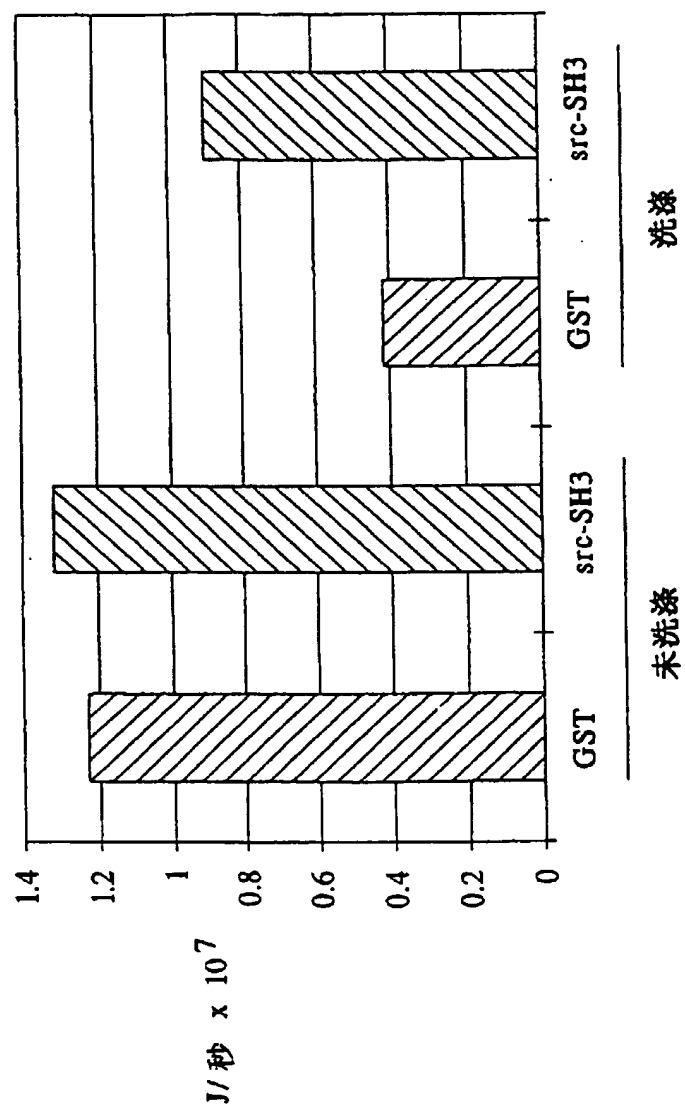
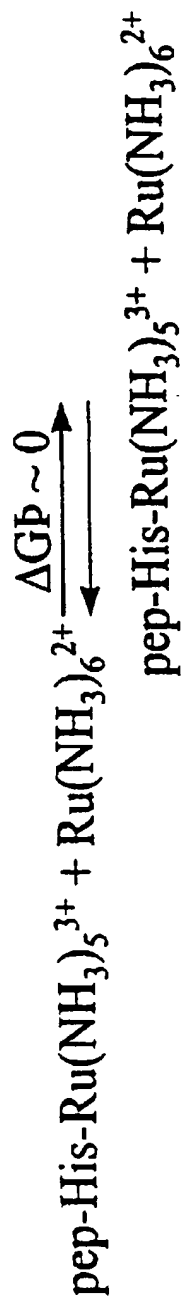
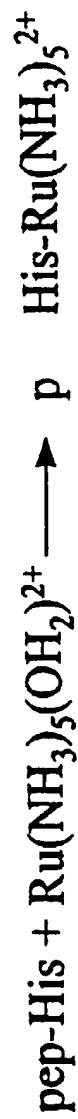


图 6



# 循环伏安法

- 扫描基本上与时间成线性
- 与扫描速率的明确依赖性
- 电流~局部介质的浓度
- 重复扫描产生相同信号
- 一次扫描: 1 秒-1 分钟

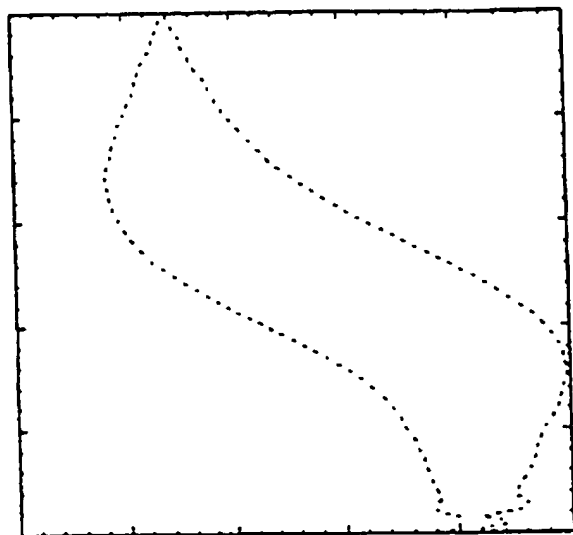


图 7

图 8

TB10619 + TB20619

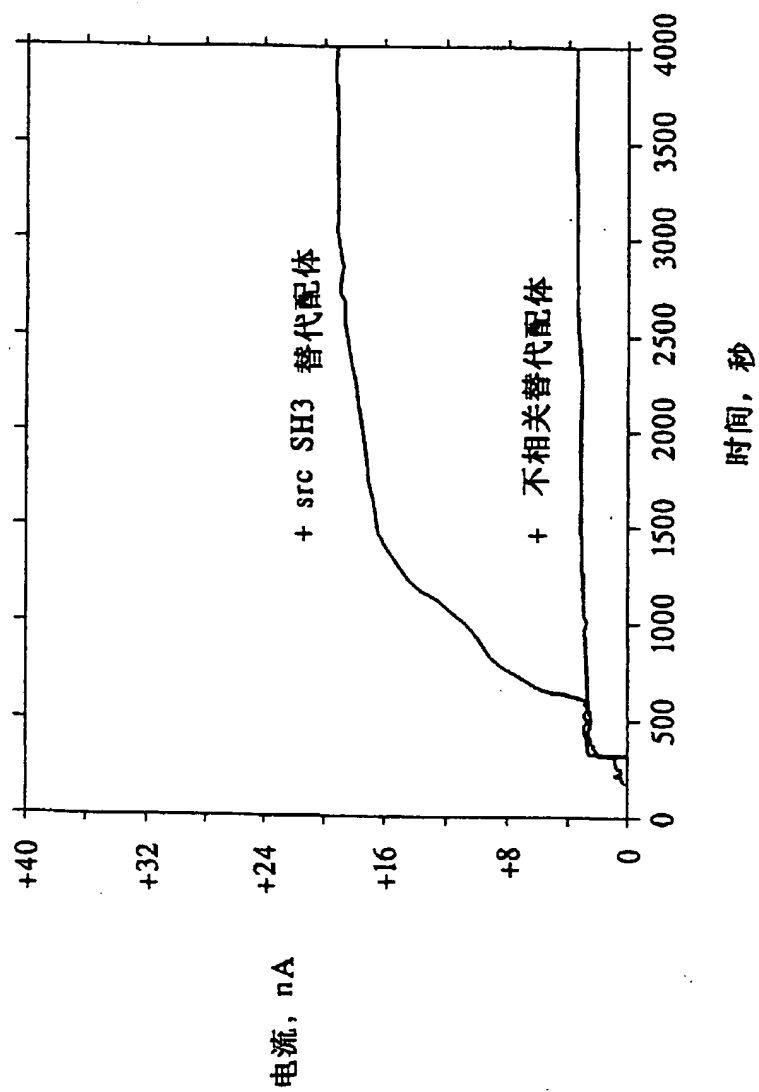
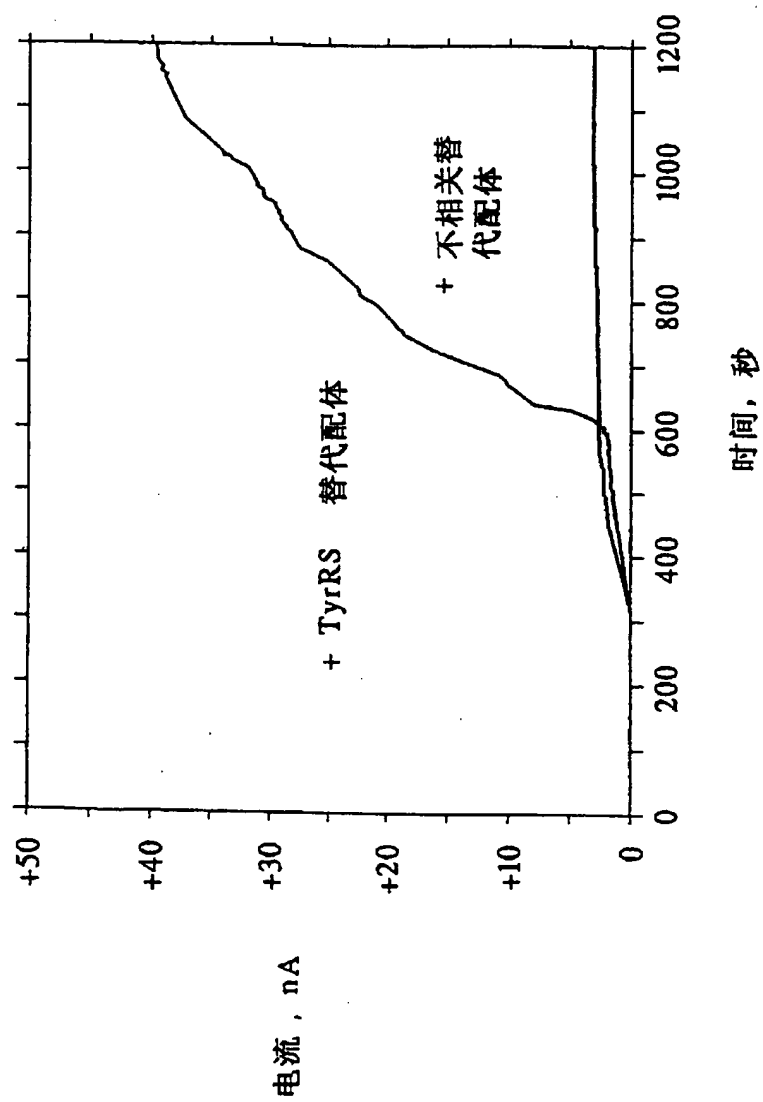


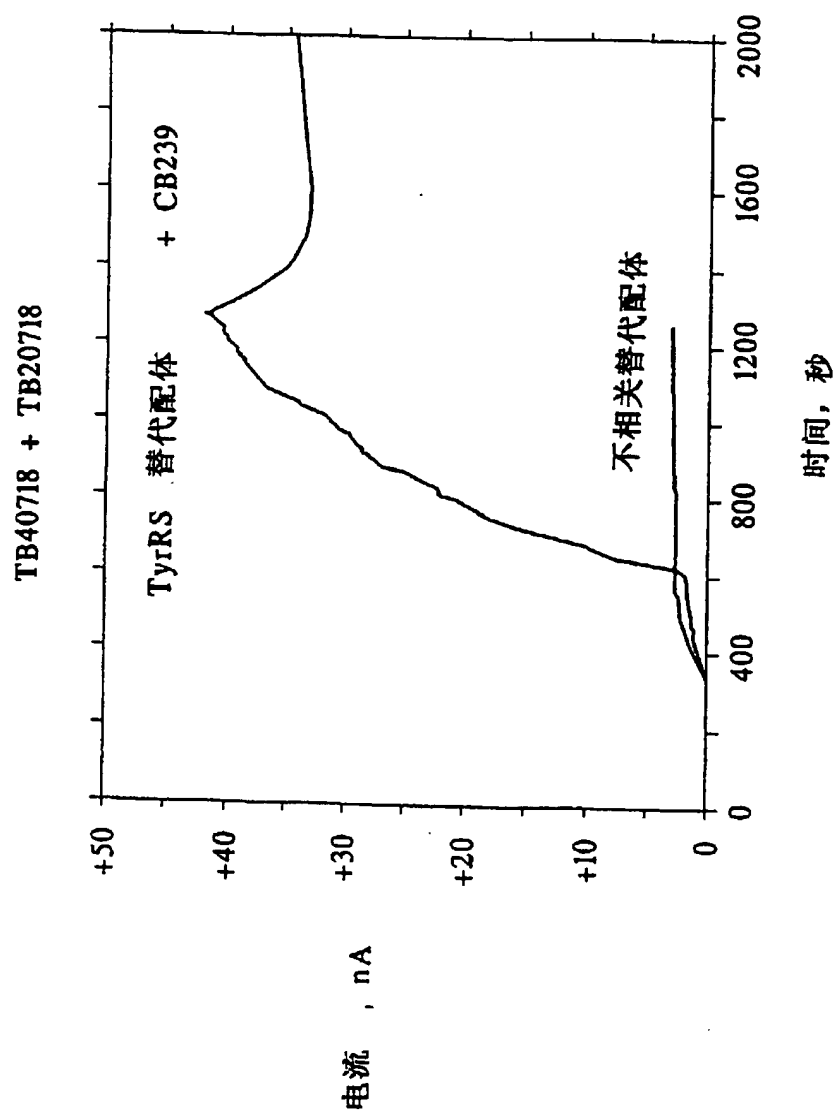
图 9

TB20718 + TB40718



— — — —

图 10



000000

图 11

TBI0723 + TB20723

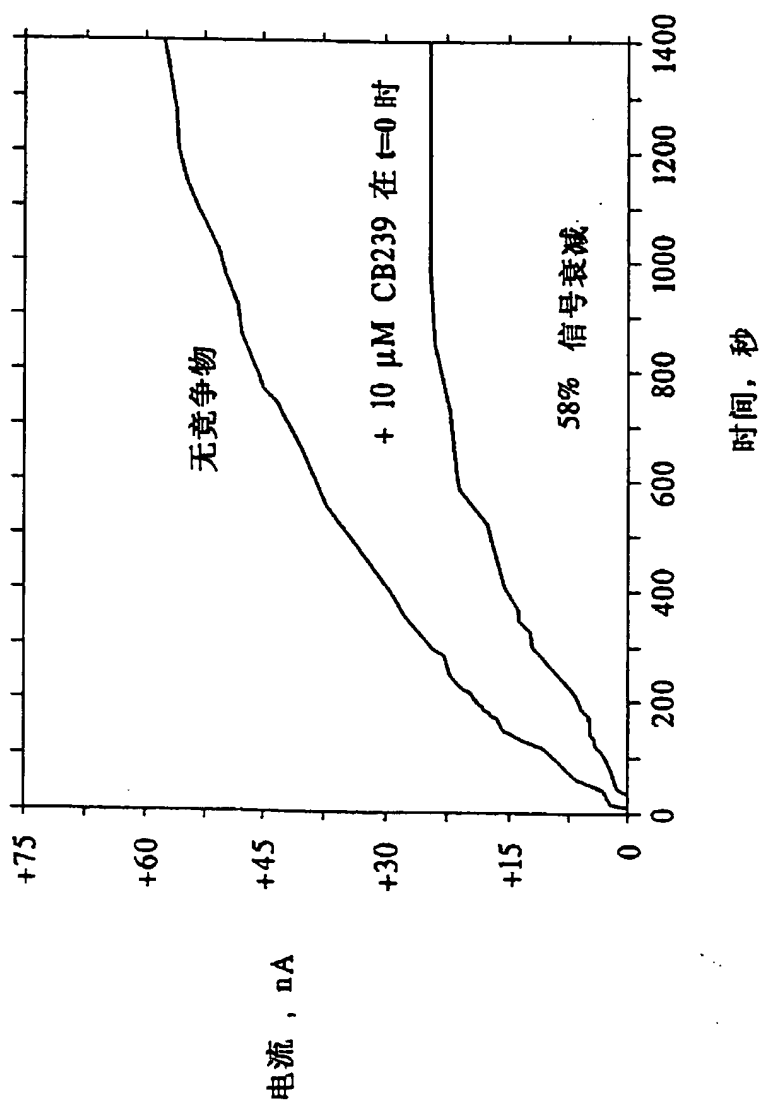




图 12

TB20722 + TB30722

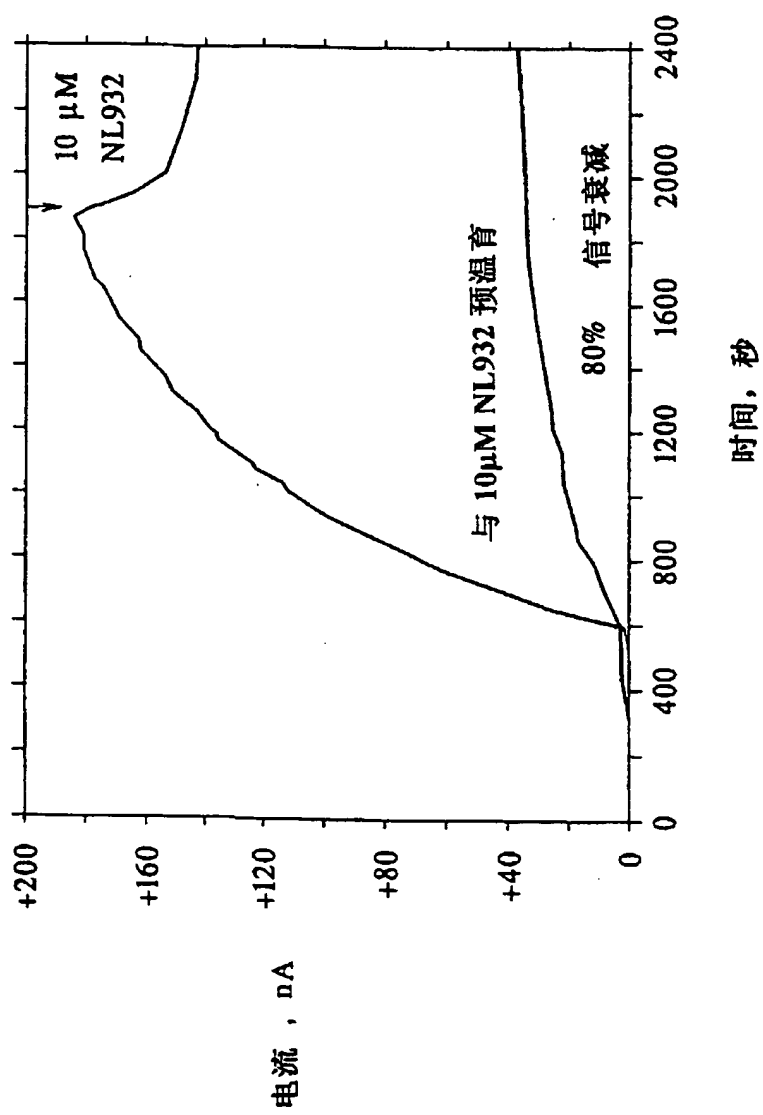
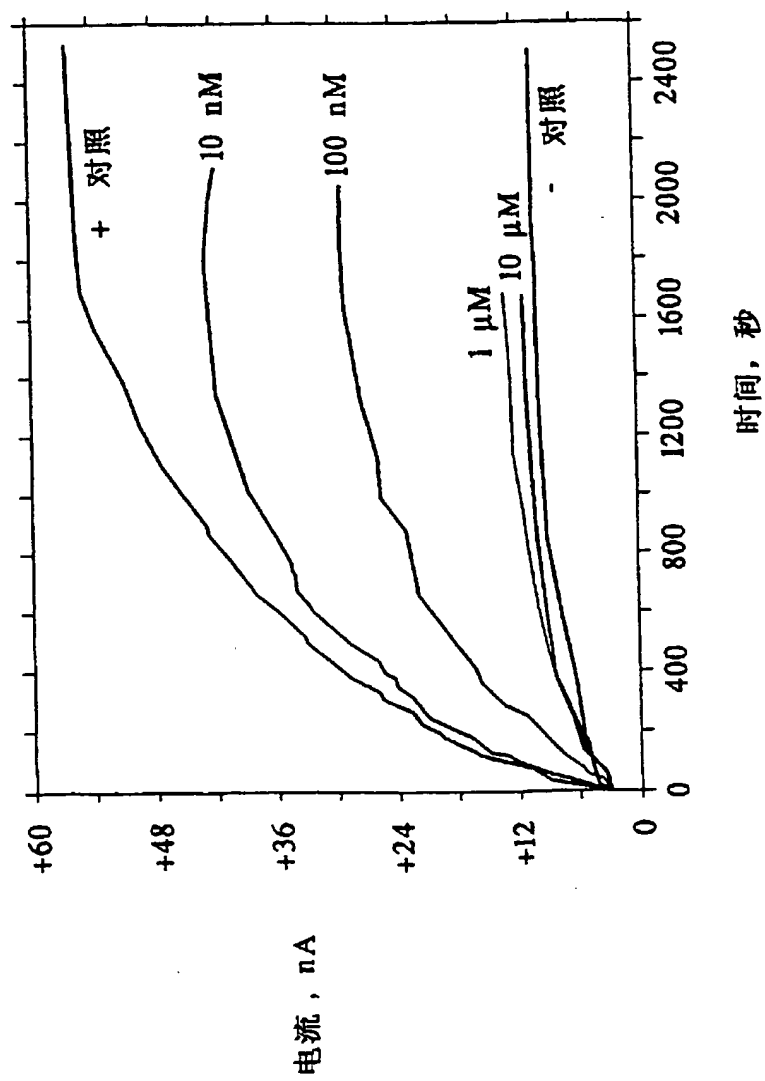


图 13

TB10822 + TB20822 + TB30822 + TB40822 + TB50822 + TB60822



$t = +2366.7s$   $i = +5.973e-008A$

图 14

